

Multivalente Präsentation von Kohlenhydraten via PNA•DNA-Hybridisierung

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

M. Sc. Christian Scheibe

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Stefan Hecht, Ph. D.

Gutachter: 1. Prof. Dr. Oliver Seitz

2. Prof. Dr. Christoph Arenz

Tag der Einreichung: 29.05.2012

Tag der mündlichen Prüfung: 16.08.2012

ZUSAMMENFASSUNG

Die Wechselwirkung zwischen Kohlenhydraten und Lektinen ist relativ schwach. Dennoch ist sie in einer Fülle biologischer Prozesse von essentieller Bedeutung. Eine Verstärkung der Bindungsaffinität wird häufig durch Multivalenz, d. h. die Ausbildung mehrerer Bindungen zwischen zwei Bindungspartnern, realisiert. Neben der reinen Anzahl der präsentierten Liganden spielt jedoch auch deren Positionierung im Raum eine große Rolle. In dieser Arbeit wurde ein molekulares Lineal entwickelt, das einen modular aufgebauten PNA•DNA-Duplex als Gerüst nutzt und die Präsentation von Liganden im Raum mit atomarer Auflösung ermöglicht. Die Anzahl der präsentierten Liganden, der Abstand zwischen diesen und die Flexibilität des Gerüsts, das diese verbindet, können einerseits fein moduliert werden und sind andererseits sehr gut vorhersagbar. Mittels diverser Bindungsassays wurde zunächst gezeigt, dass das Werkzeug für die räumliche Rasterung von Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen geeignet ist. Die ermittelten räumlichen Anordnungen der Bindungstaschen von *Erythrina cristagalli* Lektin (ECL) und *Ricinus communis* Agglutinin (RCA₁₂₀) waren in Übereinstimmung mit den Kristallstrukturanalysen. Im Fall von RCA₁₂₀ wurde neben den primären Bindungstaschen zudem eine potentielle sekundäre Bindungstasche identifiziert. Anschließend wurde das Werkzeug für die räumliche Rasterung eines weniger gut charakterisierten Systems verwendet. Im Detail handelte es sich um die Wechselwirkung zwischen Selektinen und seinen Liganden wie sie während der Leukozytenadhäsionskaskade infolge einer Entzündung auftritt. Als Liganden wurden das natürliche Tetrasaccharid Sialyl-Lewis-X und ein artifizielles DNA-Aptamer präsentiert. Dabei zeigte sich, dass der Abstand zwischen zwei bivalent präsentierten Liganden nur einen geringen Einfluss auf die Bindungsaffinität hatte. Die Selektin-Moleküle besaßen demnach eine hohe Flexibilität und/oder waren nicht absolut starr in der Membran verankert.

Schlagworte: Kohlenhydrat, Lektin, Multivalenz, Peptidnukleinsäure, räumliche Rasterung

ABSTRACT

The interaction between carbohydrates and lectins is relatively weak. Still, it is of great importance in a plethora of biological processes. An enhancement of the binding affinity is often achieved via multivalency, i.e., the formation of several bonds between two binding partners. Besides the number of presented ligands, their spatial alignment is crucial as well. In this study, a molecular ruler was developed that utilizes a modularly assembled PNA•DNA duplex as scaffold and allows the presentation of ligands in space with atomic resolution. The number of presented ligands, the distance between them, and the flexibility of the scaffold that connects them can be nicely modulated and, at the same time, are very well predictable. By using various binding assays it was first shown that this tool is suitable for the spatial screening of carbohydrate-lectin interactions. The determined spatial alignments of the binding sites of *Erythrina cristagalli* lectin (ECL) und *Ricinus communis* agglutinin (RCA₁₂₀) were in agreement with the crystal structure analyses. In addition to the primary binding sites, a potential secondary binding site was identified in the case of RCA₁₂₀. Afterwards, the tool was used for the spatial screening of a system that is less well characterized. In detail, this was the interaction between selectin and its ligands as it occurs during the leukocyte adhesion cascade as a result of an inflammation. The natural tetra-saccharide sialyl-Lewis-X as well as an artificial DNA aptamer were presented as ligands. It was found that the distance between two bivalently presented ligands had only a minor effect on the binding affinity. Accordingly, the selectin molecules had a high flexibility and/or were not absolutely rigid anchored in the membrane.

Keywords: carbohydrate, lectin, multivalency, peptide nucleic acid, spatial screening

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver Seitz am Institut für Chemie im Fachinstitut für Organische und Bioorganische Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin in der Zeit von Februar 2008 bis Mai 2012 angefertigt.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
2.	Theoretische Grundlagen	2
2.1	Mechanismen multivalenter Wechselwirkungen	2
2.1.1	Intramolekulare Chelatisierung	3
2.1.2	Intermolekulare Aggregation	3
2.1.3	Statistische Rückbindung	4
2.1.4	Sterische Stabilisierung	4
2.2	Bedeutung multivalenter Wechselwirkungen in der Natur	5
2.3	Leukozytenmigration	5
2.3.1	Selektine und ihre Liganden	6
2.3.2	Mechanismus der Selektin-Ligand-Wechselwirkung	8
2.3.3	Selektin als Wirkstoffkandidat	9
2.4	Multivalente Präsentation von Kohlenhydraten	10
2.5	Nukleinsäuren – Einzigartige Gerüste zur multivalenten Präsentation von Kohlenhydraten	13
2.5.1	Der PNA•DNA-Duplex	13
2.5.2	DNA•DNA- und PNA•DNA-Duplexe zur Präsentation von Kohlenhydraten	15
3.	Zielsetzung	19
4.	Ergebnisse und Diskussion	22
4.1	Synthese der Kohlenhydrat-Liganden	22
4.1.1	Synthese von UDP-Galactose und GDP-Fucose	23
4.1.2	Synthese des Sialyl-Lewis-X-Liganden	24
4.1.3	Synthese des Mannose-Liganden	27
4.2	Synthese von Fluorescein-markierter Lactose	28
4.3	Synthese des rückgratmodifizierten PNA-Monomers	29
4.4	PNA-Oligomersynthese	30
4.5	Synthese der Kohlenhydrat-PNA-Konjugate	32
4.6	Synthese der Aptamer-PNA-Konjugate	35
4.7	Aufbau und Eigenschaften der multivalenten Kohlenhydrat- und Aptamer-PNA•DNA-Komplexe	37
4.8	Entwicklung eines molekularen Lineals auf PNA•DNA-Basis	43
4.8.1	Übersicht	43
4.8.2	Enzym-gekoppelter Lektin-Assay (ELLA)	45
4.8.2.1	Prinzip des Enzym-gekoppelten Lektin-Assays (ELLA)	45
4.8.2.2	Untersuchungen zur Bindungsaffinität von ECL mittels ELLA	47
4.8.3	Fluoreszenzanisotropie-Assay	49
4.8.3.1	Prinzip des Fluoreszenzanisotropie-Assays	49
4.8.3.2	Untersuchungen zur Bindungsaffinität von ECL mittels Fluoreszenzanisotropie	50
4.8.4	SPR-basierter Assay	52

4.8.4.1	Prinzip des SPR-basierten Assays	52
4.8.4.2	Untersuchungen zur Bindungsaffinität von ECL mittels SPR	54
4.8.4.3	Untersuchungen zur Bindungsaffinität von RCA ₁₂₀ mittels SPR	58
4.8.4.4	Untersuchungen zur Bindungsaffinität von Con A mittels SPR	65
4.8.5	Moleküldynamische Simulationen zur Untersuchung der Flexibilität	66
4.8.6	Vergleich der Ergebnisse der Bindungsstudien	68
4.9	Untersuchungen zur Bindungsaffinität von L-Selektin	70
4.9.1	Kompetitiver SPR-Assay	71
4.9.1.1	Prinzip des kompetitiven SPR-Assays	71
4.9.1.2	Inhibierung der Selektin-Bindung durch multivalente Aptamer-PNA•DNA-Komplexe	72
4.9.1.3	Inhibierung der Selektin-Bindung durch multivalente sLe ^x -PNA•DNA-Komplexe	77
4.9.2	Zellbasierter Flusskammer-Assay	80
4.9.2.1	Prinzip des zellbasierten Flusskammer-Assays	80
4.9.2.2	Inhibierung der Selektin-Bindung durch multivalente Aptamer-PNA•DNA-Komplexe	81
4.9.3	Vergleich des Bindungsverhaltens der Aptamer- und der sLe ^x -PNA•DNA-Komplexe	82
5.	Zusammenfassung und Ausblick	87
5.1	Zusammenfassung	87
5.2	Ausblick	92
6.	Experimenteller Teil	94
6.1	Geräte und Materialien	94
6.1.1	Lösungsmittel und Reagenzien	94
6.1.2	Chromatographische Methoden	95
6.1.2.1	Dünnschichtchromatographie (DC)	95
6.1.2.2	Säulenchromatographie	95
6.1.2.3	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	95
6.1.3	Schmelzpunkte	96
6.1.4	Polarimetrie	97
6.1.5	NMR-Spektroskopie	97
6.1.6	Massenspektrometrie	97
6.1.7	UV/Vis-Spektroskopie	97
6.1.8	Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie an Mikrotiterplatten	98
6.1.9	Denaturierungsexperimente	98
6.1.10	Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)	99
6.1.11	Flusskammermessungen	99
6.1.12	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	99
6.1.13	PNA-Festphasensynthese	100
6.2	Synthesevorschriften	100
6.2.1	UDP-Galactose	100
6.2.1.1	Uridin-5'-monophosphomorpholidat-4-Morpholin- <i>N,N'</i> -dicyclohexylcarboxamidinsalz (38)	100
6.2.1.2	Uridin-5'-diphospho- α -D-galactose-Monoammoniumsalz (33)	101
6.2.2	GDP-Fucose	101
6.2.2.1	Guanosin-5'-monophosphomorpholidat-4-Morpholin- <i>N,N'</i> -dicyclohexylcarboxamidinsalz (39)	101
6.2.2.2	1,2,3,4-Tetra- <i>O</i> -benzoyl- α -L-fucose (43)	102
6.2.2.3	2,3,4-Tri- <i>O</i> -benzoyl- β -L-fucose-1-dibenzylphosphat (45)	103

6.2.2.4	2,3,4-Tri- <i>O</i> -benzoyl- β -L-fucose-1-phosphat-Bis(triethylammonium)-salz (46)	103
6.2.2.5	β -L-Fucose-1-phosphat-Cyclohexylammoniumsalz (41)	103
6.2.2.6	Guanosin-5'-diphospho- β -L-fucose-Monoammoniumsalz (35)	104
6.2.3	Kohlenhydrat-Liganden	104
6.2.3.1	<i>N</i> -(4-Methoxybenzyliden)- β -D-glucosamin (49)	104
6.2.3.2	1,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- <i>N</i> -(4-methoxybenzyliden)- β -D-glucosamin (50)	105
6.2.3.3	1,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-glucosaminhydrochlorid (51)	105
6.2.3.4	1,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- <i>N</i> -((2,2,2-trichlorethoxy)carbonyl)- β -D-glucosamin (52)	105
6.2.3.5	Ethyl-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-1-thio- <i>N</i> -(2,2,2-trichlorethyloxycarbonyl)- β -D-glucosaminid (25)	106
6.2.3.6	(<i>N</i> -(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl- <i>N</i> -(2,2,2-trichlorethyloxycarbonyl)- β -D-glucosaminid (54)	106
6.2.3.7	(<i>N</i> -(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl- <i>N</i> -acetyl- β -D-glucosaminid (55)	107
6.2.3.8	(<i>N</i> -(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)- <i>N</i> -acetyl- β -D-glucosaminid (27)	108
6.2.3.9	(<i>N</i> -(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)- <i>N</i> -acetyl- β -D-lactosaminid (28)	109
6.2.3.10	(2-Aminoethyl)- <i>N</i> -acetyl- β -D-lactosaminid (80)	110
6.2.3.11	(<i>N</i> -(3'-Maleimidopropanoyl)-2-aminoethyl)- <i>N</i> -acetyl- β -D-lactosaminid (16)	110
6.2.3.12	(<i>N</i> -(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)- α -sialyl-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)- <i>N</i> -acetyl- β -D-glucosaminid (29)	111
6.2.3.13	(<i>N</i> -(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)- α -sialyl-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -L-fucosyl-(1 \rightarrow 3)]- <i>N</i> -acetyl- β -D-glucosaminid (30)	112
6.2.3.14	(2-Aminoethyl)- α -sialyl-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -L-fucosyl-(1 \rightarrow 3)]- <i>N</i> -acetyl- β -D-glucosaminid (86)	114
6.2.3.15	(<i>N</i> -(3'-Maleimidopropanoyl)-2-aminoethyl)- α -sialyl-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -L-fucosyl-(1 \rightarrow 3)]- <i>N</i> -acetyl- β -D-glucosaminid (17)	115
6.2.3.16	Pentaacetyl-D-mannose (56)	116
6.2.3.17	(2-Bromethyl)-2,3,4,5-tetraacetyl- α -D-mannosid (57)	116
6.2.3.18	(2-Azidoethyl)-2,3,4,5-tetraacetyl- α -D-mannosid (58)	116
6.2.3.19	(2-Azidoethyl)- α -D-mannosid (59)	117
6.2.3.20	(2-Aminoethyl)- α -D-mannosid (32)	117
6.2.3.21	(<i>N</i> -(3'-Maleimidopropanoyl)-2-aminoethyl)- α -D-mannosid (18)	117
6.2.4	Fluorescein-markierte Lactose	118
6.2.4.1	Octaacetyl-D-lactose (61)	118
6.2.4.2	2,3,5,2',3',4',5'-Heptaacetyl-(2-bromethyl)- β -D-lactosid (62)	119
6.2.4.3	2,3,5,2',3',4',5'-Heptaacetyl-(2-azidoethyl)- β -D-lactosid (63)	119
6.2.4.4	2-Azidoethyl- β -D-lactosid (64)	120
6.2.4.5	2-Aminoethyl- β -D-lactosid (65)	120
6.2.4.6	(<i>N</i> -(5(6)-Carboxyfluoresceinoyl)-2-aminoethyl)- β -D-lactosid (67)	120
6.2.5	Rückgratmodifiziertes PNA-Monomer	121
6.2.5.1	(<i>R</i>)- <i>N</i> -Fluorenylmethoxycarbonyl- <i>S</i> -tritylcystein-weinrebamid (69)	121
6.2.5.2	(<i>R</i>)- <i>N</i> -Fluorenylmethoxycarbonyl-1-(<i>S</i> -tritylthiomethyl)-aminoethylglycinmethylester (70)	122
6.2.5.3	(<i>R</i>)- <i>N</i> -[<i>N</i> -Fluorenylmethoxycarbonyl-1-(<i>S</i> -tritylthiomethyl)-aminoethyl]- <i>N</i> -[(1-thyminy)-acetyl]-glycinmethylester (72)	123
6.2.5.4	(<i>R</i>)- <i>N</i> -[<i>N</i> -Fluorenylmethoxycarbonyl-1-(<i>S</i> -tritylthiomethyl)-aminoethyl]- <i>N</i> -[(1-thyminy)-acetyl]-glycin (19)	124
6.2.6	PNA-Festphasensynthese	125
6.2.6.1	Protokoll zur automatisierten Festphasensynthese nach der Fmoc/Bhoc-Strategie	125
6.2.6.2	Allgemeine Arbeitsvorschrift für die automatisierte Synthese von PNA-Oligomeren	127

6.2.7	Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Ligation von Maleimidoglykosiden an Thiol-modifizierte PNA	128
6.2.8	Aptamer-PNA-Konjugate	130
6.2.8.1	5'-[N-(3'-Maleimidopropanoyl)-6-aminohexyl]-GCG GTA ACC AGT ACA AGG TGC TAA ACG TAA TGG CGC-3' (22)	130
6.2.8.2	Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Ligation von Maleinimid-funktionalisierter DNA an Thiol-modifizierte PNA	130
6.3	Zusammensetzung der multivalenten Kohlenhydrat- und Aptamer-PNA•DNA-Komplexe	131
6.3.1	Verwendete DNA-Template	131
6.3.2	Zusammensetzung der multivalenten Kohlenhydrat-PNA•DNA-Komplexe	132
6.3.3	Zusammensetzung der multivalenten Aptamer-PNA•DNA-Komplexe	135
6.4	Assays	136
6.4.1	SPR-basierter Assay	136
6.4.1.1	Beladung der Sensor-Chips	136
6.4.1.2	Herstellung der Proben	136
6.4.1.3	Kinetische Messungen	136
6.4.2	Enzym-gekoppelter Lektin-Assay (ELLA)	140
6.4.2.1	Verwendete Puffer	140
6.4.2.2	Herstellung der Proben	140
6.4.2.3	Standard-Protokoll für ELLA	141
6.4.2.4	Berechnung der IC ₅₀ -Werte	141
6.4.3	Fluoreszenzanisotropie-Assay	142
6.4.3.1	Verwendete Puffer	142
6.4.3.2	Bestimmung der Dissoziationskonstante	142
6.4.3.3	Bestimmung der IC ₅₀ -Werte	143
6.4.4	Kompetitiver SPR-Assay	144
6.4.4.1	Verwendete Puffer	144
6.4.4.2	Beladung des Sensor-Chips	144
6.4.4.3	Herstellung der Proben mit sLe ^x -PNA•DNA-Komplex	145
6.4.4.4	Herstellung der Proben mit Aptamer-PNA•DNA-Komplex	145
6.4.4.5	SPR-Messungen	146
6.4.4.6	Berechnung der IC ₅₀ -Werte der sLe ^x - und Aptamer-PNA•DNA-Komplexe	146
6.4.5	Zellbasierter Flusskammer-Assay	147
6.5	MD-Simulationen	148
7.	Literaturverzeichnis	150
8.	Anhang	158
8.1	NMR-Spektren	158
8.2	HPLC-Chromatogramme und MALDI-Spektren der PNA-Oligomere	184
8.3	Abkürzungsverzeichnis	188
	Danksagung	193
	Lebenslauf	195
	Publikationsverzeichnis	197
	Selbstständigkeitserklärung	199

1. EINLEITUNG

Innerhalb des komplexen Netzwerks an Wechselwirkungen in der Natur ist die Interaktion zwischen Kohlenhydraten und kohlenhydratbindenden Proteinen (Lektinen) relativ schwach. Dennoch ist sie in einer Fülle biologischer Prozesse von essentieller Bedeutung.^[1-2] Zum Beispiel wird die Migration von Leukozyten in entzündetes Gewebe durch eine komplexe Kaskade an Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen eingeleitet.^[3] Die Infektion mit Influenzaviren beruht ebenfalls auf der Wechselwirkung zwischen dem viralen Oberflächenprotein Hämagglutinin und dem Kohlenhydrat Sialinsäure auf dem bronchialen Epithel.^[4] Beim Befall des Harntraktes mit uropathogenen *Escherichia Coli* Bakterien kommt es unter anderem zu einer Wechselwirkung zwischen dem Lektin-ähnlichen G-Protein an den Spitzen der Bakterienfilamente und dem P_K-Antigen-Abschnitt (α Gal(1→4)Gal) der epithelialen Glykolipide.^[5] Daneben gibt es noch zahlreiche, andere Beispiele; allen ist gemein, dass nicht nur ein einzelner Kohlenhydrat-Ligand mit einer einzelnen Protein-Bindungstasche wechselwirkt, sondern eine Vielzahl. Die Ausbildung mehrerer Bindungen zwischen zwei Bindungspartnern bezeichnet man als multivalente Wechselwirkung. Wenngleich der offensichtlichste Vorteil die erhöhte Bindungsaffinität ist, zeichnen sich diese multivalenten Wechselwirkungen durch zahlreiche andere Eigenschaften aus, die mehr als die Summe ihrer Einzelwechselwirkungen sind.^[6] Durch die Ausbildung multivalenter Bindungen ist beispielsweise die Kontaktfläche zwischen den Bindungspartnern vergrößert, was wiederum eine effizientere und schnellere Kommunikation zwischen diesen ermöglicht.

Obwohl das Phänomen der Multivalenz bereits seit längerem bekannt ist, werden die zugrunde liegenden Mechanismen nur langsam aufgeklärt. Grundvoraussetzung für die Identifikation der optimalen molekularen Eigenschaften, die zu einer erhöhten Bindungsaffinität führen, ist die Verwendung eines Gerüsts, das die exakte Einstellung 1) der Anzahl der Liganden, 2) des Abstands zwischen den Liganden und 3) der räumlichen Orientierung der Liganden erlaubt.^[7-8] In den letzten Jahren sind vermehrt Nukleinsäuregerüste in den Fokus gerückt, erfüllen sie doch nahezu perfekt diese Anforderungen.^[9] Bei der DNA-Doppelhelix handelt es sich um ein einzigartiges Molekül mit bemerkenswerten Eigenschaften. Aufgrund der Rigidität und Periodizität ist die doppelhelikale Struktur mit atomarer Auflösung definiert. Die gezielte Anbringung von biologisch aktiven Molekülen ermöglicht demnach die Generierung von hoch definierten, multivalenten Strukturen. Diese könnten nicht nur zur Aufklärung von multivalenten Wechselwirkungsmechanismen, sondern auch zur Charakterisierung von multivalenten, biologischen Systemen und Strukturen verwendet werden, was wiederum bei der Entwicklung von therapeutischen Wirkstoffen von Nutzen sein könnte. Ferner könnten die so erzeugten multivalenten Architekturen auch direkt als hochpotente Bindungspartner Verwendung finden.

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Mechanismen multivalenter Wechselwirkungen

Unter multivalenten Wechselwirkungen versteht man die Ausbildung mehrerer Bindungen zwischen zwei Bindungspartner, z. B. einem multivalent präsentierten Kohlenhydrat-Liganden und einem multivalenten Lektin (Rezeptor).^[6] Multivalente Kohlenhydratsysteme zeichnen sich gegenüber ihren monovalenten Pendants durch eine erhöhte Affinität bei der Bindung multivalenter Lektine aus. Häufig übertrifft diese Affinitätssteigerung jene, welche durch die Erhöhung der Valenz und damit verbunden, der Konzentration an präsentierten Kohlenhydrat-Liganden, zu erwarten wäre. Die Ursachen dafür können sein: 1) die anfängliche, intermolekulare Wechselwirkung zwischen Kohlenhydrat-Ligand und Lektin führt zu einer energetischen Begünstigung der nachfolgenden, intramolekularen Wechselwirkungen; 2) die intermolekularen Wechselwirkungen führen zum Aufbau eines Netzwerks aus Ligand-Rezeptor-Komplexen; 3) sollte ein Ligand-Rezeptor-Komplex dissoziieren, kann dieser durch die Verfügbarkeit von mehreren Liganden einfacher rekombinieren; und 4) die erhöhten Stabilitäten der multiplen Wechselwirkungen verhindern eine Dissoziation des Komplexes und erfordern multiple Dekomplexierungsschritte. Die Affinitätssteigerungen bei multivalenten Wechselwirkungen auf wenige Parameter einzugrenzen stellt eine Herausforderung dar, zumal es unwahrscheinlich ist, dass ein einzelnes Experiment vermag, die einzelnen Beiträge aufzuschlüsseln, die zu der beobachteten Affinitätssteigerung führen. Betrachtet man die bisherigen Untersuchungen zur Multivalenz, so

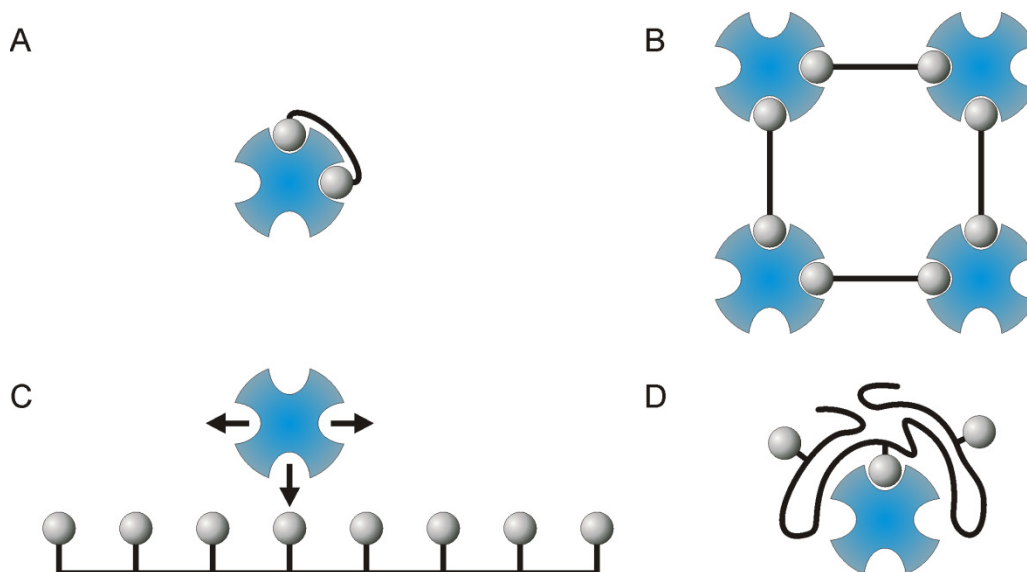


Abbildung 1: Multivalente Wechselwirkungsmechanismen zwischen einem multivalenten Liganden (grau) und einem tetravalenten Rezeptor (blau): A) intramolekulare Chelatisierung, B) intermolekulare Aggregation, C) statistische Rückbindung und D) sterische Stabilisierung.

sind bisher vier Mechanismen identifiziert worden: A) intramolekulare Chelatisierung, B) intermolekulare Aggregation, C) statistische Rückbindung (auch als interne Diffusion bekannt) und D) sterische Stabilisierung (siehe Abbildung 1).^[8]

2.1.1 Intramolekulare Chelatisierung

Bei der Wechselwirkung zwischen zwei Liganden, die über einen Linker miteinander verbrückt sind, und einem Molekül mit zwei Bindungsstellen, kann nach dem ersten Bindungsereignis, bei dem genau ein Ligand mit genau einer Bindungsstelle wechselwirkt, der zweite Ligand entweder intramolekular an die noch freie Bindungsstelle des gleichen Moleküls oder intermolekular an die Bindungsstelle eines anderen Moleküls binden (vergleiche Abbildung 1A und B). Auf den ersten Blick sind intramolekulare Wechselwirkungen gegenüber intermolekularen stets bevorzugt, da sich die zweite Bindungsstelle des gleichen Moleküls in räumlicher Nähe zu der ersten befindet, die Wahrscheinlichkeit für die intramolekulare Bindung demnach größer ist. Allerdings ist diese Annahme Einschränkungen unterworfen, da der Linker einen großen Einfluss auf das zweite Bindungsereignis hat. An dieser Stelle sei angemerkt, dass, im Rahmen dieser Betrachtungen, dem Linker eine passive Rolle zugeordnet wird und dieser nicht mit dem Rezeptor wechselwirkt. Ist der Abstand zwischen den Liganden kürzer als der zwischen den Bindungsstellen im Rezeptor, ist eine intramolekulare Bindung nur dann möglich, wenn entweder der Linker sich dehnt oder der Rezeptor sich dem Liganden anpasst. In der Realität ist damit ein erheblicher Energieaufwand verbunden, der jeglichen Energiegewinn durch das zweite Bindungsereignis aufheben würde. Durch Verlängerung des Linkers kann dieses Problem umgangen werden. Allerdings nimmt der Vorteil der räumlichen Nähe der zweiten Bindungsstelle mit zunehmender Linkerlänge ab. Im Umkehrschluss bedeutet dies eine höhere Wahrscheinlichkeit für intermolekulare Wechselwirkungen.

Neben der Länge spielt auch die Flexibilität des Linkers eine Rolle. Prinzipiell vergrößert sich der Konformationsraum mit steigender Linkerflexibilität und damit verbunden, die Wahrscheinlichkeit, dass die für eine intramolekulare Bindung notwendige Konformation von dem bivalenten Liganden eingenommen werden kann. Andererseits vergrößert sich mit steigender Flexibilität auch die Konformationsentropie, die aufgewendet werden muss, um den Linker in diese Konformation zu überführen. Durch Versteifung des Linkers kann dieser Energieaufwand zwar verringert werden, doch führt dies auch wieder zu einer Verkleinerung des Konformationsraums.

2.1.2 Intermolekulare Aggregation

Im Gegensatz zur intramolekularen Wechselwirkung zwischen multivalenten Liganden und Rezeptoren ist die intermolekulare Wechselwirkung prinzipiell immer möglich, wenngleich es

auch in diesem Fall Faktoren gibt, die zu deren Begünstigung beitragen. Zum einen müssen die Liganden in einem ausreichenden Abstand präsentiert werden. Ein zu kurzer Linker zwischen den Liganden könnte dazu führen, dass es zwischen daran gebundenen Rezeptormolekülen zur Abstoßung kommt. Sind die Liganden jedoch in entsprechender Geometrie und Distanz angeordnet, können intermolekulare Wechselwirkungen zur Ausbildung von zwei- oder dreidimensionalen Netzwerken aus Ligand-Rezeptor-Komplexen führen (siehe Abbildung 1B).^[10] Die dabei gebildeten Aggregate könnten, durch die räumliche Anordnung der Rezeptormoleküle zueinander, durch Protein-Protein-Wechselwirkungen stabilisiert werden.

2.1.3 Statistische Rückbindung

Prominentestes Beispiel für statistische Rückbindung, oder wie es in diesem Fall genannt wird, den „bind and slide“-Mechanismus, ist die Wechselwirkung zwischen DNA-bindenden Proteinen und DNA.^[11] Hierbei bindet das Protein zunächst schwach an nichtspezifische Basenpaare und diffundiert dann durch Auflösen der Bindung und sofortige Neubildung, im Zusammenspiel mit der Brownschen Molekularbewegung, entlang des DNA-Rückgrats bis es eine hochaffine Bindungsstelle findet.^[12] Die hohe Affinität von diversen Glykoclustern gegenüber Lektinen wurde ebenfalls auf statistische Rückbindung zurückgeführt.^[13] Dabei konnte gezeigt werden, dass das Lektin nur eine einzelne Bindung mit dem Glykocluster eingeht. Dieses anfängliche Bindungsereignis führt jedoch dazu, dass sich das Lektin bei Aufhebung dieser Bindung in räumlicher Nähe zu dem Glykocluster befindet, welcher wiederum eine Vielzahl potentieller Bindungspartner präsentiert (siehe Abbildung 1C). Folglich ist die Wahrscheinlichkeit für eine erneute Bindung an den Glykocluster erhöht. Die Lebensdauer des Ligand-Rezeptor-Komplexes erhöht sich, was sich in einer Verringerung der makroskopisch beobachteten Dissoziationskonstante widerspiegelt.

2.1.4 Sterische Stabilisierung

Bei ihren Untersuchungen zur Inhibierung der Wechselwirkung zwischen voluminösen Glykoclustern und multivalenten Lektinen stellten Whitesides und Mitarbeiter die Hypothese auf, dass voluminöse Glykocluster die Oberfläche der Lektine sterisch abschirmen und dadurch die Annäherung anderer potentieller Bindungspartner an deren Oberfläche inhibieren (siehe Abbildung 1D).^[14] Theoretisch ist es möglich, dass eine einzelne schwache Bindung genügt, um den Glykocluster in die räumliche Nähe des Proteins zu bringen und dessen sterischer Anspruch das Protein vor Wechselwirkungen mit anderen Teilchen abschirmt. Zwar erhöht diese sterische Stabilisierung nicht aktiv die Affinität der bindenden Spezies, aber es verringert die der anderen potentiellen Bindungspartner.

2.2 Bedeutung multivalenter Wechselwirkungen in der Natur

Aufgrund der Vielzahl an funktionellen Vorteilen von multivalenten Wechselwirkungen gegenüber monovalenten, kommt Multivalenz in einer Fülle biologischer Systeme vor. Offensichtlichster Vorteil ist, dass multivalente Wechselwirkungen prinzipiell die Stärke einer monovalenten Wechselwirkung übersteigen können. Statt immer affinere monovalente Wechselwirkungen zu generieren, scheint es effizienter, die vorhandenen schwachen Bindungen durch Anordnung in einem Verbund zu stärken. Auf diese Weise könnte jenen Organismen entgegengetreten werden, die einen evolutionären Vorteil in Form einer zufällig generierten (z. B. infolge von Umwelteinflüssen), hoch potenten Wechselwirkung besitzen, ohne eine weitere, noch stärkere Wechselwirkung generieren zu müssen.^[6]

Multivalente Wechselwirkungen ermöglichen die Variation von biologischen Signal- und Antwortprozessen, die über ein simples „an“ und „aus“ hinausgeht. Prinzipiell erlaubt die Zu- oder Abnahme der Bindungspartner eine abgestufte Signaltransduktion, welche durch Einbeziehung einer Mischung aus unterschiedlichen Ligand-Rezeptor-Paaren weiter moduliert werden kann („heteromere Multivalenz“). Die Ausbildung mehrerer Bindungen statt einer einzelnen erhöht die Kontaktfläche zwischen den Bindungspartnern. Durch diesen „konformen“ Kontakt ist eine effizientere und schnellere Kommunikation zwischen den beiden Spezies möglich. Des Weiteren können dadurch konformative Änderungen in den Bindungspartnern induziert werden, welche wiederum Signale für nachgeschaltete Prozesse darstellen können.^[6]

2.3 Leukozytenmigration

Die Reizung von Zellen mit pathologischen Stimuli wie z. B. Infektionserregern oder Verletzungen initiiert eine komplexe Wechselwirkungskaskade (siehe Abbildung 2), die zur Migration von Leukozyten aus der Blutbahn in das geschädigte Gewebe führt und das Ziel hat, den Reiz zu beseitigen. Im ersten Schritt kommt es dabei zur Anheftung der Leukozyten an das Endothel. Vermittelt wird dies durch die Wechselwirkungen zwischen L-, E- und P-Selektin sowie diversen glykosylierten Liganden, maßgeblich den P-Selektin-Glykoproteinliganden 1 (PSGL-1).^[15] Als Folge dieser Wechselwirkungen kommt es zum Rollen der Leukozyten auf den Endothelzellen. Im Gegensatz zu der schnellen Bewegung im Blutstrom, bewegen sich die Leukozyten bei dieser rollenden Bewegung so langsam, dass auf den entzündeten Endothelzellen befindliche Chemokine mit spezifischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auf den Leukozyten wechselwirken können. Dadurch wird in den Leukozyten eine Signalkaskade ausgelöst, an deren Ende die Aktivierung von Integrinen steht. Ging man früher davon aus, dass Integrine ausschließlich die feste Adhäsion der Leukozyten an die Endothelzellen bewirken, indem sie mit transmembranen

Glykoproteinen des Endothels wechselwirken, ist heute bekannt, dass diese auch am Rollen der Leukozyten beteiligt sind, wenngleich weniger effektiv als Selektine, und dieses dadurch verlangsamen.^[3]

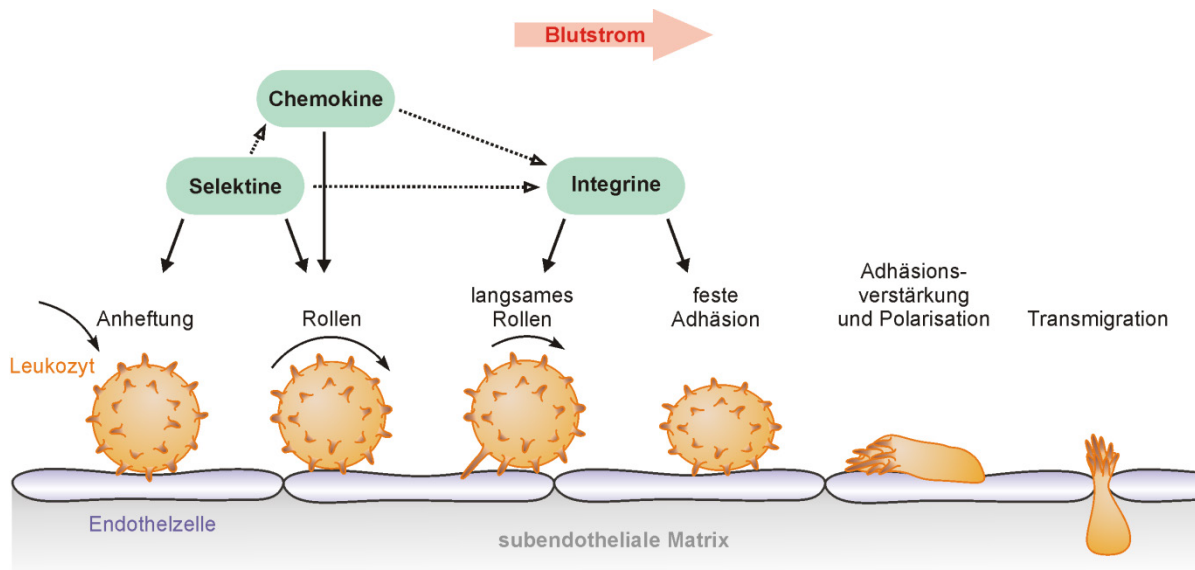


Abbildung 2: Leukozytenadhäsionskaskade. Selektine initiieren die Anheftung der Leukozyten an die Endothelzellen und führen zum Rollen dieser auf den Endothelzellen. Dabei kommt es zu Wechselwirkungen mit Chemokinen auf den Leukozyten, wodurch wiederum Integrine aktiviert werden. Je nach Aktivierungsgrad vermitteln Integrine das langsame Rollen oder die feste Adhäsion. Außerdem vermitteln sie die Polarisation und Transmigration der Leukozyten in das darunterliegende Gewebe.^[15]

Die Bindung von Integrinen an ihre endothelialen Liganden führt zur festen Adhäsion der Leukozyten an die Endothelzellen. Daneben werden durch diese Bindung aber auch diverse intrazelluläre Signale erzeugt, welche zum einen die Adhäsion verstärken und dadurch ein rasches Ablösen der Leukozyten verhindern^[16-18] und zum anderen die Polarisation der Leukozyten und deren Verteilung auf dem Endothel bewirken. Anschließend kriechen die Leukozyten entlang des Endothels auf der Suche nach einer günstigen Stelle für die Transmigration in das entzündete Gewebe.^[3] Im Gewebe angekommen tragen sie je nach Typ unterschiedlich zur Immunantwort bei. Während Neutrophile zytotoxische Stoffe absondern, die unspezifisch fremde Erreger oder Stoffe bekämpfen, produzieren Lymphozyten zielgerichtete Antikörper. Monozyten wandeln sich in Makrophagen um und beseitigen Fremdkörper durch Phagozytose.^[19]

2.3.1 Selektine und ihre Liganden

Selektine sind Proteine, die über eine einzelne Transmembranregion in der Membran verankert sind (siehe Abbildung 3). Während sich am C-Terminus eine kurze zytoplasmatische Domäne befindet, schließt sich an den N-Terminus ein extrazellulärer Bereich bestehend aus drei verschiedenen Proteindomänen an. Dieser besteht aus einer Kohlenhydrat-erkennenden Domäne, einer EGF-ähnlichen Domäne und sich wiederholenden Konsensus-einheiten, deren Anzahl je

nach Spezies und Selektin variiert.^[20] L-Selektin wird konstitutiv auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert. Hingegen wird die Expression von E-Selektin auf den meisten Endothelzellen (Ausnahme bilden die Endothelzellen der Haut und des Knochenmarks) erst durch eine Entzündung induziert. P-Selektin befindet sich, ebenfalls konstitutiv, in Blutplättchen und Endothelzellen, wird dort aber in Zellorganellen gespeichert, die erst bei Stimulation mit der Plasmamembran fusionieren und so zu dessen Verteilung auf der Zelloberfläche führen.^[15]

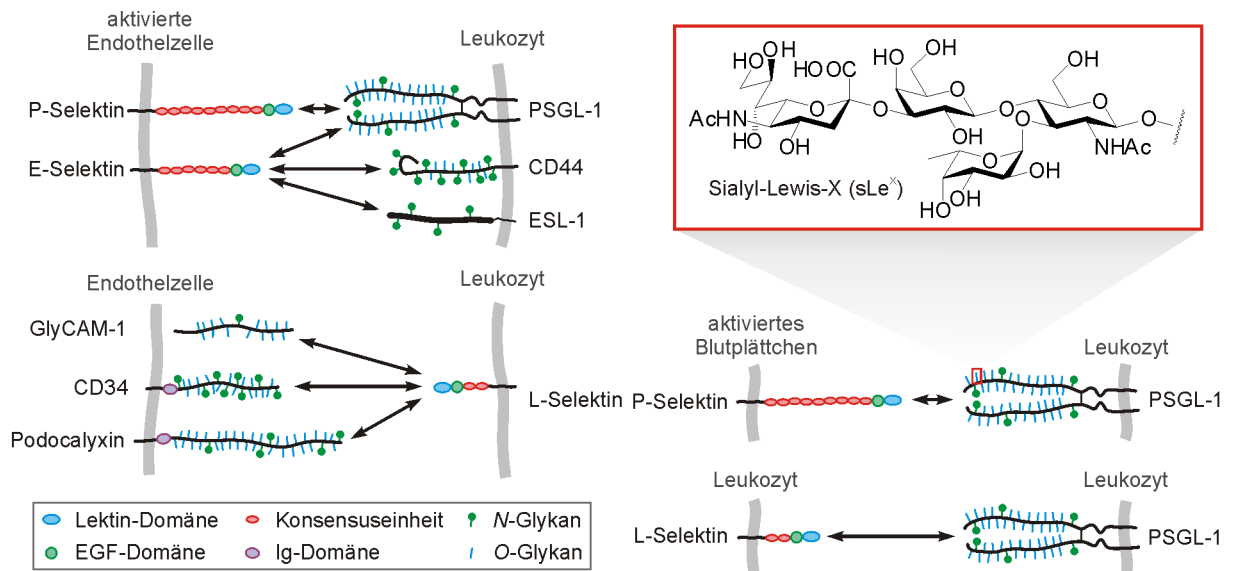


Abbildung 3: Wechselwirkungen zwischen L-, E- und P-Selektin und ihren wichtigsten Glykoproteinen. Oben rechts ist die Sialyl-Lewis-X-Einheit eines O-Glykans von PSGL-1 gezeigt.^[15]

Die Lektin-Domänen aller drei Selektine binden an die Sialyl-Lewis-X-Einheit der oberflächengebundenen Glykoliganden (siehe Abbildung 3).^[20] Sialyl-Lewis-X (sLe^x) stellt jedoch nur den Minimalliganden dar. P- und L-Selektin, nicht jedoch E-Selektin, binden bevorzugt an sulfatierte Glykoproteine, die zudem fucosyliert und sialyliert sind. Der dominante Ligand für P- und L-Selektin ist PSGL-1, ein homodimeres Mucin, das hauptsächlich auf Leukozyten, aber auch einigen aktivierten Endothelzellen vorkommt.^[21] Seine Untereinheiten enthalten multiple Sulfo-tyrosine sowie an Serin und Threonin gebundene O-Glykane. Aufgrund von stereospezifischen Wechselwirkungen mit mehreren Aminosäuren, insbesondere Sulfo-tyrosinen, sowie einem sLe^x-O-Glykan in der Nähe des N-Terminus von PSGL-1, bindet es mit höherer Affinität als sLe^x allein.^[22-24] L-Selektin bindet außerdem an die endothelialen Mucine GlyCAM-1, CD34 und Podocalyxin. Hier ist die hohe Bindungsstärke auf eine Kombination an N- und O-Glykanen mit 6-Sulfo-sLe^x (sLe^x, dessen GlcNAc an Position C6 sulfatiert ist) zurückzuführen.^[25-28] Im Gegensatz dazu weist E-Selektin keine Affinität für geladene Sulfat-Gruppen auf. Auch wenn die genauen Gründe dafür nicht geklärt sind, so sind PSGL-1, ESL-1 (E-Selektin-Ligand 1) und CD44 die bevorzugten Liganden.^[29]

2.3.2 Mechanismus der Selektin-Ligand-Wechselwirkung

Bei der Adhäsion von Leukozyten an die Innenwände der Blutgefäße übt der Blutstrom eine permanente Kraft auf die daran beteiligten Bindungspartner aus. Diese Zugkraft kann die Lebensdauer der ausgebildeten Bindungen verkürzen, aber auch verlängern. Wird die Lebensdauer verkürzt, spricht man von einer „slip“-Bindung, bei Verlängerung, von einer „catch“-Bindung.^[30] Die Bindung zwischen einem Selektin und seinem Liganden folgt dabei einem biphasischen Verlauf: mit zunehmender Krafteinwirkung erfolgt ein Übergang von „catch“- zu „slip“-Bindung, d. h. die Lebensdauer der Bindung erhöht sich zunächst, erreicht ein Maximum und nimmt anschließend wieder ab.^[31-32]

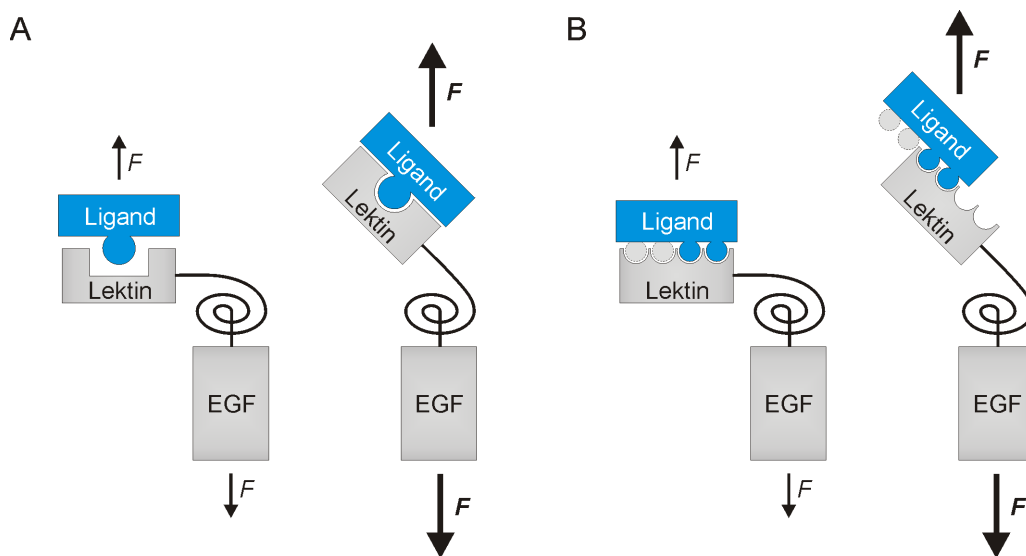


Abbildung 4: Modelle für die „catch“-Bindung zwischen Selektin (grau) und Ligand (blau). A) Allosterisches Modell, B) Rückbindungs-Modell. Bei erhöhter Krafteinwirkung von außen kommt es in dem Bereich zwischen der Lektin- und der EGF-Domäne (dargestellt durch eine Feder) zu einer Konformationsänderung.^[15]

Für die „catch“-Bindung werden bislang zwei Modelle diskutiert (siehe Abbildung 4). Beide beruhen darauf, dass die Lektin- und EGF-Domänen von Selektinen eine gebogene und eine gestreckte Konformation einnehmen können.^[23] Bei dem allosterischen Modell^[33-34] liegt das Selektin im Grundzustand in der gebogenen Konformation vor, Liganden binden an die Bindungsstelle der Lektin-Domäne, jedoch mit geringer Affinität. Durch Zugkrafteinwirkung wird das Selektin in seine gestreckte Konformation überführt. Damit einher geht auch eine Änderung in der Ligandenbindungsstelle, welche, aufgrund zusätzlicher Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen, jetzt eine höhere Affinität und damit Lebensdauer für den Liganden aufweist. Bei dem zweiten Modell^[35-36] führt eine angelegte Zugkraft ebenfalls zu einer Änderung in die gestreckte Konformation. Anstatt direkt von der Bindungsstelle weggezogen zu werden, gleitet der Ligand jedoch in dieser Konformation über die Selektinoberfläche. Wechselwirkungen lösen sich dabei auf, werden jedoch sofort durch neue ersetzt. Die Lebensdauer der Bindung erhöht sich. Dieser

Mechanismus ähnelt dem der statistischen Rückbindung (siehe Kapitel 2.1.3), wird in diesem Fall jedoch erst durch äußere Krafteinwirkung induziert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ausbildung von „catch“-Bindungen eine minimale Scherkraft erfordert. Unterhalb dieser werden Leukozyten nicht eingefangen und rollen auch nicht auf der Endotheloberfläche. Andererseits bleibt das Rollen bei zu hoher Schubbeanspruchung ebenfalls aus.^[37] Diese kraftabhängige Adhäsion ist vermutlich auch der Grund dafür, dass Leukozyten, die sowohl L-Selektin als auch PSGL-1 auf ihrer Oberfläche präsentieren, nicht miteinander wechselwirken und aggregieren. Die Geschwindigkeitsunterschiede sind im Blutstrom einfach zu gering für die Ausbildung von „catch“-Bindungen.^[35]

Die Oberfläche von Leukozyten ist übersät mit Mikrovilli, ca. 1 µm langen Ausstülpungen, deren Spitzen mit L-Selektin und PSGL-1 bedeckt sind. Diese konzentrierte Präsentation ist typisch für die Anordnung der Selektine und ihrer Liganden. So kommen E- und P-Selektin in Clustern auf den Endothelzellen vor, genauer gesagt in clathrinbedeckten Einstülpungen.^[38-40] Ferner kommt es zu Anhäufungen von E-Selektin auf der endothelialen Membran, indem dieses mit Lipid Rafts assoziiert.^[40] Dies stellt auch die Ursache für die Bündelung von PSGL-1 auf den Mikrovillispitzen dar.^[41] Sowohl die clathrinbedeckten Einstülpungen als auch die Lipid Rafts wechselwirken mit dem Zytoskelett und fixieren dadurch indirekt PSGL-1, E-Selektin und P-Selektin in der Membran. Im Gegensatz dazu ist L-Selektin durch direkte Wechselwirkung seiner zytoplasmatischen Domäne mit dem Zytoskelett in der Membran fixiert. Zumindest im Fall von L-Selektin konnte gezeigt werden, dass diese Verankerung mit dem Zytoskelett essentiell für das Einfangen und Rollen der Leukozyten ist.^[42-43] Weitere Studien konnten zeigen, dass durch die dichte Präsentation von E- und P-Selektin auf den Endothelzellen das Rollen der Leukozyten verlangsamt wird.^[38-40] Vermutlich stellt die indirekte Wechselwirkung mit dem Zytoskelett, im Fall von PSGL-1, E-Selektin und P-Selektin, auch sicher, dass diese bei Krafteinwirkung ihre Position in der Membran beibehalten und ihren jeweiligen Cluster nicht verlassen. Neben der Tatsache, dass durch die Ausbildung multipler Bindungen die Zugkraft je Bindung reduziert wird, d. h. „catch“-Bindungen begünstigt werden, tragen multivalente Wechselwirkungen per se zur Affinitätssteigerung und damit dem effektiven Rollen der Leukozyten bei. Des Weiteren wird klar, dass nicht nur die Anzahl und Dichte der präsentierten Selektine und Liganden einen Einfluss haben, sondern auch deren räumliche Anordnung.

2.3.3 Selektin als Wirkstoffkandidat

Chronische Entzündungen resultieren häufig aus Fehlfunktionen der Leukozytenmigration und sind die Ursache für zahlreiche Autoimmunerkrankungen wie Schuppenflechte, rheumatoider Arthritis, Asthma oder multipler Sklerose.^[19] Die übermäßige, unkontrollierte und andauernde

Migration von Leukozyten begünstigt nicht mehr die Wundheilung, sondern führt infolge zusätzlicher Reizung zu weiterer Schädigung des Gewebes. Die an der Leukozytenmigration beteiligten Selektine stellen demnach potentielle Ziele für die therapeutische Behandlung dieser Krankheiten dar.

Wie in Kapitel 2.3.1 erläutert, sind die wichtigsten natürlichen Selektin-Liganden PSGL-1 (L- und P-Selektin) und ESL-1 (E-Selektin). Das minimale Bindungsmotiv ist das Tetrasaccharid sLe^X . Die Bindungsaffinität für die Bindung von sLe^X ist jedoch sehr gering. In statischen Assays wurden IC_{50} -Werte im unteren millimolaren Bereich bestimmt.^[44-45] Mit dem Ziel potentere Selektin-Antagonisten zu erzeugen, wurden zahlreiche Kohlenhydrat-Mimetika von sLe^X synthetisiert.^[46-47] Die Darstellung von hochaffinen Bindern für eine, evolutionär bedingt, schwache Bindungstasche stellte jedoch eine große Herausforderung dar, weshalb es, trotz intensiver Bemühungen, nur ein Bruchteil davon in klinische Untersuchungen schaffte.^[19] Ein weiterer Ansatz ist die Imitation der natürlichen Multivalenz. Zum Beispiel stellten Renkonen und Mitarbeiter multivalente L-Selektin-Inhibitoren her, die über ein verzweigtes Oligosaccharid bis zu vier sLe^X -Liganden präsentierten (siehe Abbildung 5).^[48] Dabei inhibierte das tetravalente Substrat **1** *in vitro* die Adhäsion von Lymphozyten an Endothelzellen infolge einer akuten Nierentransplantat-abstoßung mehr als 20 (valenzkorrigiert: 5) Mal besser als monovalentes sLe^X .

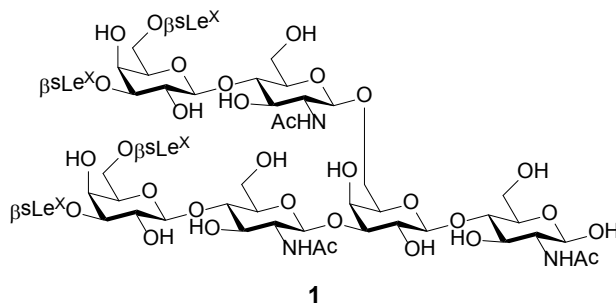


Abbildung 5: Verzweigtes Oligosaccharid zur multivalenten Präsentation von vier sLe^X -Liganden (**1**).^[48]

Die Kombination beider Ansätze, d. h. die Verwendung von multivalenten Inhibitoren, in Verbindung mit optimierten, hochaffinen Selektin-Liganden, stellt einen vielversprechenden Ausgangspunkt für die künftige Entwicklung von potenten Wirkstoffen für die therapeutische Modulation der Leukozytenmigration dar.

2.4 Multivalente Präsentation von Kohlenhydraten

Mit dem Ziel, immer größere Affinitätssteigerungen zu realisieren, wurde in den letzten Jahrzehnten eine Fülle an hochvalenten Kohlenhydratstrukturen synthetisiert. Unter Verwendung von Polymeren,^[14, 49-50] Dendrimeren^[51-53] und Nanopartikeln^[54-56] als Gerüst konnten zwar beeindruckende Ergebnisse erzielt werden, doch war die Genauigkeit und Vorhersagbarkeit, insbe-

sondere in Bezug auf die räumliche Orientierung der präsentierten Kohlenhydrat-Liganden, eher gering. So spielt neben der reinen Anzahl an präsentierten Liganden, auch deren Positionierung im Raum eine große Rolle.^[7-8] Die exakte räumliche Ausrichtung von mehreren Kohlenhydrat-Liganden ist jedoch eine Herausforderung. Im Folgenden sind einige herausragende Arbeiten genannt, die sich dieser Aufgabe angenommen haben.

Ein beeindruckendes Beispiel dafür, wie das zielgerichtete Design eines multivalenten Liganden zu enormen Affinitätssteigerungen führen kann, zeigten Kitov *et al.* mit ihrem Molekül STARFISH (**2**), einem hochpotenten Inhibitor für das Shiga-ähnliche Toxin I (SLT-I) (siehe Abbildung 6).^[57-58] SLT-I ist ein bakterielles Toxin mit AB₅-Struktur, dessen homopentamere B₅-Untereinheit ringförmig um die A-Untereinheit angeordnet ist. Die 15 Bindungstaschen für das Trisaccharid $\alpha\text{Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{Glc}$, jeweils drei pro B-Untereinheit, sind alle auf einer Seite des Toxins angeordnet. STARFISH (**2**) wurde so entworfen, dass fünf bivalente Liganden via flexibler Linker über ein Glucose-Molekül als Kern verbrückt sind. Mit einem IC₅₀ im subnanomolaren Bereich führte die decavalente Präsentation in STARFISH (**2**) zu einer mehr als eine Million Mal besseren Inhibierung als im monovalenten Fall. In der Kristallstruktur (siehe Abbildung 6) zeigte sich, dass die zehn Liganden in STARFISH (**2**) nicht ausschließlich intramolekular mit einem Toxin-Molekül wechselwirkten, sondern auch intermolekular mit einem zweiten Toxin-Molekül. Als Hauptursache dafür gaben die Autoren an, dass die Affinitäten von 5 der 15 Bindungstaschen wesentlich höher wären und folglich eine intermolekulare Bindung an zweimal fünf Bindungstaschen der intramolekularen Bindung gegenüber bevorzugt wäre. Die intermolekulare Wechselwirkung wurde sicherlich auch dadurch begünstigt, dass nach erfolgter Bindung an eine B₅-Untereinheit, die verbliebenen fünf Liganden bereits die räumliche Anordnung für die

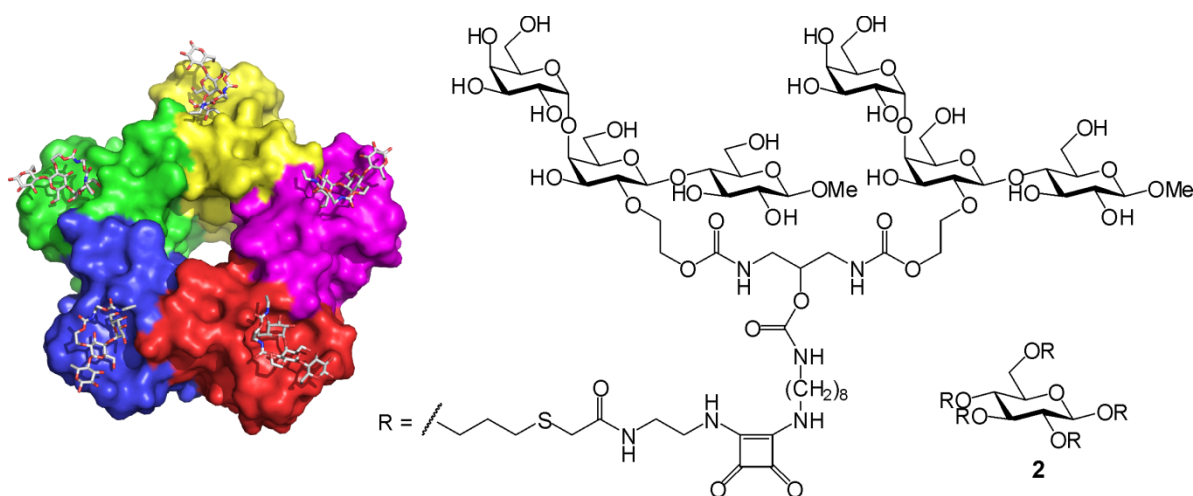


Abbildung 6: Kristallstruktur (1qnu.pdb) der B₅-Untereinheit des Shiga-ähnlichen Toxins I (SLT-I) mit gebundenen STARFISH (**2**). 5 der 15 Bindungstaschen sind mit Trisaccharid-Liganden besetzt. Die flexible Kernregion von STARFISH (**2**) konnte nicht modelliert werden, da die Elektronendichte davon nicht klar zu erkennen war.^[57-58]

Bindung an eine weitere B₅-Untereinheit eingenommen hatten. Wenngleich die erreichte Affinitätssteigerung bereits beeindruckend sei, wiesen die Autoren darauf hin, dass ein weniger flexibles Gerüst womöglich zu einer noch höheren Affinität führen könnte.

Fan *et al.* machten ähnliche Beobachtungen, als sie Inhibitoren für bakterielle AB₅-Toxine entwarfen.^[59-62] Im Unterschied zu SLT-I besaßen das untersuchte Cholera toxin und das hitzelabile Enterotoxin jedoch nur eine Bindungstasche je B-Untereinheit. Die verwendeten Inhibitoren setzten sich aus fünf Liganden zusammen, die über flexible Linker an einen zentralen Kern (ein cyclisches Amin oder Peptid) angebracht waren. Bei Variation der Linkerlänge und/oder Kerngröße konnte eine Abstandsabhängigkeit auf die Bindungsaffinität beobachtet werden. Außerdem konnte durch Verdopplung der Ligandenzahl von fünf auf zehn die Affinität weiter gesteigert werden, was der Möglichkeit zur Bildung von 1:2-Komplexen aus Inhibitor und Toxin zugeschrieben wurde (analog der Bindung von STARFISH (2) an SLT-I).

In einem kombinatorischen Ansatz stellten Wittmann und Mitarbeiter eine Bibliothek aus 19440 cyclischen Neoglykopeptiden her, wobei die räumliche Präsentation der *N*-Acetylglucosamin-Liganden durch Variation der Aminosäuresequenz diversifiziert wurde. Die Tatsache, dass lediglich sieben Vertreter der Bibliothek eine signifikant erhöhte Affinität gegenüber Weizenkeimagglutinin (WGA), einem dimeren Lektin mit insgesamt acht Bindungsstellen, aufwiesen, verdeutlicht den Einfluss der räumlichen Orientierung der multivalent präsentierten Kohlenhydrat-Liganden auf die Bindungsaffinität.^[63-64] Interessanterweise hatten auch einige tetra- und

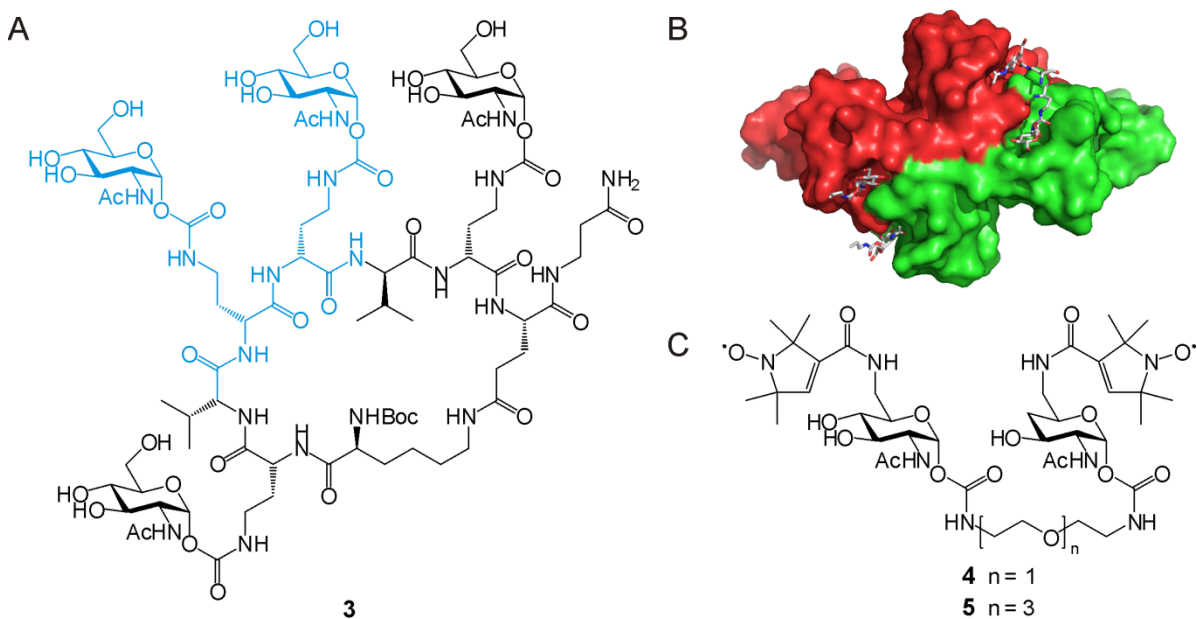


Abbildung 7: A) Tetravalentes Cyclopeptid **3**. B) Kristallstruktur (2x3t.pdb) von WGA mit gebundenen **3**. Das an der Bindung beteiligte Fragment ist in A blau gezeichnet. Schwarz gezeichnete Bereiche konnten nicht modelliert werden, da deren Elektronendichte nicht klar zu erkennen war. C) Mit Spinsonden markierte bivalente GlcNAc-Liganden **4** und **5**.^[65-66]

pentavalenten Glykopeptide ähnliche oder gar höhere Affinitäten als ein Großteil der hexavalenten Vertreter. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das tetravalente cyclische Glykopeptid **3** synthetisiert (siehe Abbildung 7A).^[65] In einem Enzym-gekoppelten Lektin-Assay (ELLA) inhibierte dies die Bindung von WGA an immobilisiertes GlcNAc 25500 (valenzkorrigiert: 6400) Mal besser als monovalentes *N*-Acetylglucosamin. Eine Kristallstruktur (siehe Abbildung 7B) zeigte schließlich, dass bis zu vier Moleküle **3** mit jeweils zwei Liganden an die acht Bindungsstellen von WGA binden können. Die hohe Affinität begründeten die Autoren mit der eingeschränkten Flexibilität des cyclischen Peptids. Diese führte dazu, dass die Liganden bereits eine Konformation einnahmen, die eine bivalente Bindung an WGA begünstigte. Dafür sprach auch, dass das an der Bindung beteiligte Fragment allein (blau gekennzeichnet in Abbildung 7A), wegen seiner höheren Flexibilität, eine wesentlich geringere Affinität aufwies.

Mit Hilfe von Elektronenspinresonanz (EPR)-Spektroskopie wurde zudem eindrucksvoll gezeigt, dass die Länge des Linkers zwischen den Liganden ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Bindung spielt.^[66] Die Kohlenhydrat-Liganden der bivalenten Komplexe **4** und **5** (siehe Abbildung 7C) waren mit Spinsonden markiert, mittels derer die Entfernung zwischen diesen, unter Verwendung diverser EPR-spektroskopischer Methoden, bestimmt werden konnte. Die erhaltenen Abstandsverteilungen erlaubten direkte Rückschlüsse auf den Bindungsmechanismus. Demzufolge war der Komplex **4** wegen des zu kurzen Linkers nur zu monovalenter Bindung an WGA fähig, während Komplex **5** mit dem längeren Linker bivalent an WGA band.

2.5 Nukleinsäuren – Einzigartige Gerüste zur multivalenten Präsentation von Kohlenhydraten

2.5.1 Der PNA•DNA-Duplex

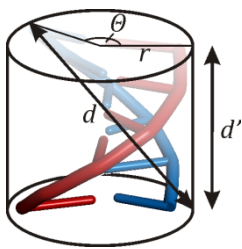
Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist nicht nur der Träger der genetischen Erbinformation, sondern auch ein Molekül mit außergewöhnlichen, strukturellen Eigenschaften. Ein DNA-Einzelstrang besteht aus vielen Desoxyriboseeinheiten, die über Phosphodiester miteinander verknüpft sind und an denen eine der vier Nukleobasen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin gebunden ist. Zwischen diesen Nukleobasen kommt es zu π -Stapelwechselwirkungen und Wasserstoff-Brückenbindungen, welche bei ausreichender Stärke dazu führen, dass zwei DNA-Einzelstränge miteinander hybridisieren und eine Doppelhelix mit definierter Geometrie ausbilden.

Von diesem simplen, aber dennoch leistungsstarken, System inspiriert, wurden zahllose Versuche unternommen, dieses weiter zu optimieren. Eine beeindruckende Entdeckung machten Nielsen *et al.* 1991, als diese das komplette Phosphodesoxyribose-Rückgrat durch ein Pseudopeptid bestehend aus *N*-(2-Aminoethyl)glycin-Einheiten ersetzten.^[67] Obwohl Peptidnuklein-

säure (PNA) das Verhalten von DNA imitiert, sind einige ihrer physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften außergewöhnlich.^[68] Da die Oligomerisierung von PNA, im Gegensatz zu DNA, auf der simplen Knüpfung einer Amid-Bindung beruht, ist diese resistenter gegenüber Basen und starken Säuren und folglich, die parallele Synthese oder Anknüpfung von kleinen oder Makromolekülen weniger eingeschränkt. Durch das Fehlen von negativen Ladungen im PNA-Rückgrat besitzen PNA•DNA-Duplexe zudem eine höhere thermische Stabilität als entsprechende DNA•DNA-Duplexe. Einerseits ist dadurch deren Integrität bei sehr niedrigen Konzentrationen gewährleistet, andererseits bilden auch sehr kurze PNA-Stränge einen Duplex mit komplementärer DNA aus. Des Weiteren ist PNA nicht anfällig für einen enzymatischen Abbau durch Nukleasen und Proteasen, was wiederum Studien in biologischen Umgebungen vereinfacht.

Die strukturellen Eigenschaften des PNA•DNA-Duplex wurden mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt.^[69] Demzufolge nimmt dieser eine Mischung aus A- und B-DNA ein. Die Helix hat einen Durchmesser von 23 Å und eine Ganghöhe von 42 Å. Bei durchschnittlich 28° helikaler Drehung je Basenpaar sind 13 Basenpaare für eine helikale Windung nötig. Der mittlere Basenabstand beträgt 3.25 Å. Durch die Periodizität und Rigidität ist die Geometrie des PNA•DNA-Duplex, selbst für sehr lange Sequenzen, mit atomarer Auflösung definiert. Folglich können z. B. daran angebrachte Liganden mit Ångström-genauer Präzision im Raum positioniert werden.

Basierend auf dem Anstieg und der Drehung pro Basenpaar sowie dem Helixradius lässt sich der Abstand d zwischen zwei Liganden, die über einen Linker der Länge l an das Rückgrat des Duplex gebunden sind und durch n Nukleotide voneinander getrennt sind, nach Gleichung (1) berechnen. Die Gleichung berücksichtigt den Einfluss der helikalen Drehung, angegeben durch den Winkel θ zwischen den zwei Liganden (Gleichung (2)), auf den Abstand d . Zu beachten ist, dass für die Abstandsberechnung der einfache Abstand zwischen zwei direkt benachbarten Basenpaaren addiert werden muss, ausgedrückt durch $n + 1$. Außerdem wird angenommen, dass die Linker senkrecht zur Helix stehen und deren Länge l zum Helixradius addiert werden muss (Gleichung (3)).



$$d = \sqrt{(r \cdot \cos \theta - r)^2 + (r \cdot \sin \theta)^2 + ((n + 1) \cdot 3.25 \text{ Å})^2} \quad (1)$$

$$\theta = (n + 1) \cdot 28^\circ \quad (2)$$

$$r = 11.5 \text{ Å} + l \quad (3)$$

$$d' = (n + 1) \cdot 3.25 \text{ Å} \quad (4)$$

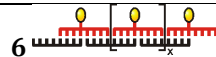
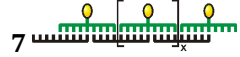
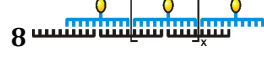
Insbesondere wenn die Liganden nur durch wenige Nukleotide voneinander getrennt sind, führt die Windung der Helix zu einer Vergrößerung des Ligandenabstandes gegenüber der reinen Ganghöhe d' . Mit steigender Anzahl an Nukleotiden zwischen den Liganden nimmt dieser Unterschied jedoch ab, weshalb bei langen Oligonukleotiden auch die vereinfachte Gleichung (4) zur Abstandsberechnung verwendet werden kann. Diese lässt die helikale Windung außer Acht.






Des Weiteren hängt der Abstand d von zahlreichen anderen Faktoren ab. Wie bereits erwähnt, steigt die Ungenauigkeit der Abstandsberechnung mit zunehmender Länge und Flexibilität des Linkers. Des Weiteren haben Einzelstrangbrüche und ungepaarte Bereiche innerhalb des Duplex Einfluss auf den Abstand. Einzelstrangbrüche verleihen dem sonst recht starren helikalen Gerüst eine gewisse Flexibilität, da sie zwar nicht die Gesamtstruktur des Duplex ändern, aber als Art Gelenk das Knicken und Drehen ermöglichen.^[70] Einzelstrangabschnitte erhöhen ebenfalls die Flexibilität des Duplex. So konnte in FRET-Messungen an DNA•DNA-Duplexen gezeigt werden, dass der mittlere Basenabstand im DNA-Einzelstrang wesentlich kleiner als im DNA-Doppelstrang ist.^[71]

2.5.2 DNA•DNA- und PNA•DNA-Duplexe zur Präsentation von Kohlenhydraten

Kobayashi und Mitarbeiter waren die ersten, die selbstorganisierende Oligonukleotide zum Aufbau von supramolekularen Glykoclustern verwendeten.^[72-73] Durch automatisierte DNA-Synthese wurden kurze DNA-Oligomere hergestellt, die intern mit einem Galactose-Ligand markiert waren und Längen von 18, 20 oder 22 Nukleotiden hatten. Diese wurden mit komplementären DNA-Strängen hybridisiert, welche jeweils die gleiche Länge hatten, allerdings keine Gal-Liganden trugen. Die DNA-Sequenzen wurden dabei so gewählt, dass die gebildeten DNA•DNA-Duplexe überhängende Enden hatten, d. h. die linke Hälfte der Gal-DNA-Oligomere war komplementär zur rechten Hälfte der unmodifizierten DNA und umgekehrt (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Bindungsparameter für die Wechselwirkung zwischen den Gal-DNA•DNA-Komplexen **6** – **8** und RCA₁₂₀.^[73]

Komplex ^[a]	Abstand/Å	Torsion/°	K_{af}/M^{-1}	n_H
6 	57	103	$1.9 \cdot 10^4$	1.8
7 	63	34	$5.5 \cdot 10^4$	2.4
8 	70	34	-	-

^[a]  ,  ,  = DNA-Einzelstrang,  = komplementärer DNA-Einzelstrang,  = Gal. (K_{af} = beobachtete Affinitätskonstante, n_H = Hill-Koeffizient)

Anschließend wurden die erhaltenen Gal-DNA•DNA-Komplexe **6** – **8**, die sich in ihren Abständen und Winkeln zwischen den präsentierten Gal-Liganden unterschieden, auf ihr Bindungsverhal-

ten gegenüber *Ricinus communis* Agglutinin (RCA_{120}) untersucht. RCA_{120} ist ein tetrameres Lektin mit zwei Bindungstaschen für Galactose im Abstand von ca. 130 Å.^[74-75] Der Komplex **7** hatte die höchste Affinität. Der bestimmte Hill-Koeffizient^[76-77] von 2.4 wies zudem auf eine multivalente Bindung hin. Die Tatsache, dass die Affinität und der Hill-Koeffizient bei Komplex **6** reduziert waren, begründeten die Autoren damit, dass der Torsionswinkel von 103°, im Gegensatz zu 34° bei Komplex **7**, ungünstiger für eine multivalente Bindung an RCA_{120} war. An dieser Stelle sollte jedoch erwähnt werden, dass eine genaue Bestimmung des Winkels zwischen den Liganden, aufgrund des Vorhandenseins von Einzelstrangbrüchen im Komplex, nur bedingt möglich ist (siehe Kapitel 4.8.5). Der Komplex **8** präsentierte die Liganden ebenfalls in einem Winkel von 34°, allerdings in größeren Abständen als **7**. Dieser vergrößerte Abstand führte jedoch dazu, dass Komplex **8** keine signifikante Bindung gegenüber RCA_{120} aufwies.

Auch wenn in diesen Arbeiten nur wenige Komplexe untersucht wurden, konnte gezeigt werden, dass Nukleinsäuregerüste zur multivalenten Präsentation von Kohlenhydraten geeignet sind. Außerdem konnte das Bindungsverhalten der präsentierten Liganden durch Variation des Abstands und des Winkels zwischen den Liganden moduliert werden.

Erst kürzlich erzeugten Winssinger und seine Mitarbeiter bivalente Man-PNA•DNA-Komplexe durch Hybridisierung von terminal mannosylierten PNA-Oligomeren (**9** und **10** in Abbildung 8) mit komplementären DNA-Templatsträngen.^[78] Die Abstände zwischen den Liganden wurden durch Variation des DNA-Templats verändert. Kam es dabei zur Ausbildung von Einzelstrangabschnitten zwischen den Man-PNA-Oligomeren, wurde ein unmodifizierter PNA-Einzelstrang zur Aufrechterhaltung der helikalen Struktur zugegeben (siehe Tabelle 2). Zusätzlich dazu wurden die Anzahl der Kohlenhydrateinheiten innerhalb der Liganden sowie deren Abstand untereinander variiert. Die erhaltenen Komplexe wurden auf ihr Bindungsverhalten gegenüber 2G12, einem humanen Antikörper mit Aktivität gegenüber HIV, untersucht. Laut Kristallstruktur bildet dieser ein verschachteltes Dimer mit drei Bindungstaschen aus.^[79]

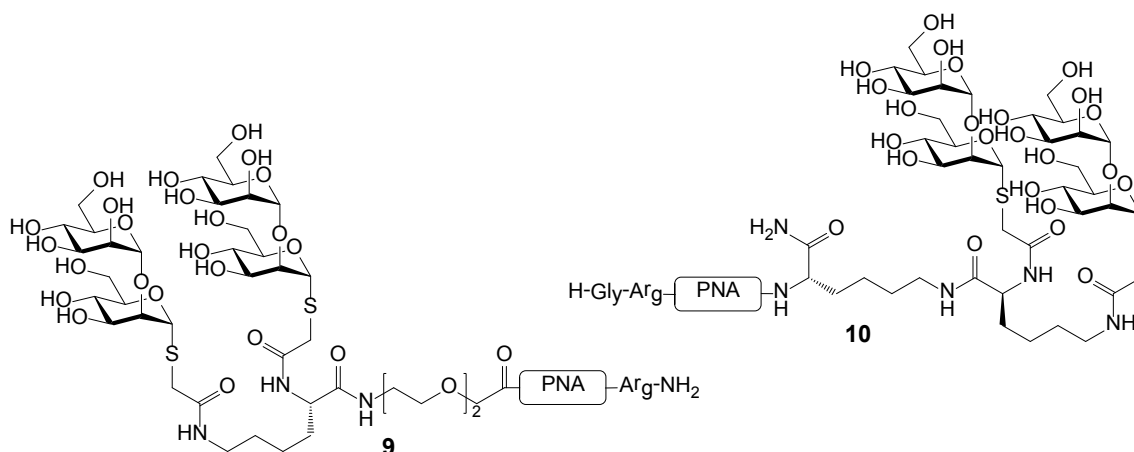


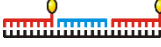







Abbildung 8: N- und C-terminal mannosylierte PNA-Oligomere **9** und **10**.^[78]

Tabelle 2: Bindungsparameter für die Wechselwirkung zwischen den Man₄-PNA•DNA-Komplexen **11** – **15** und 2G12.^[78]

Komplex ^[a]	Abstand/Å	$K_D/\mu\text{M}$
11 	3	4.2
12 	35	8.1
13 	67	17.3
14 	99	89.4
15 	32	6.4

^[a]  = PNA-Einzelstrang,  = komplementärer DNA-Einzelstrang,  = Man₄. (K_D = Dissoziationskonstante)

Von der Vielzahl an untersuchten Komplexen banden jedoch nur jene an 2G12, die Tetramannose-Liganden präsentierten, bei denen die beiden Dimannoseeinheiten durch einen 11 Atome langen Linker (siehe Abbildung 8) separiert waren. Mit Verweis auf die Kristallstruktur schlussfolgerten die Autoren, dass nur dieser Ligand die Geometrie der Bindungstaschen adäquat wiedergäbe. Die entsprechenden Tetramannose-Liganden wurden in den Komplexen **11** – **14** in Abständen von 3 – 99 Å präsentiert, wobei die Bindungsstärke mit kleiner werdenden Abständen zunahm (siehe Tabelle 2). Ein Grund für die geringe Dissoziationskonstante in **11** könnte gewesen sein, dass die beiden Liganden derart angeordnet waren, dass eine intramolekulare Bindung an zwei der drei Bindungstaschen von 2G12 begünstigt war. Da jedoch keine kürzeren Abstände oder monovalenten Komplexe untersucht worden sind, kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob die hohe Affinität von **11** auf eine optimale räumliche Anordnung der beiden Liganden zurückzuführen war oder das Resultat statistischer Effekte war.^[80] Zusätzlich dazu wurde auch der Komplex **15** untersucht, der, analog den Komplexen von Kobayashi *et al.*, durch Hybridisierung überlappender Stränge erzeugt wurde. Obwohl angenommen werden konnte, dass dieser stark polymerisierte, war dessen Affinität vergleichsweise gering. Grund dafür war vermutlich, dass sich der berechnete K_D -Wert auf die Konzentration an DNA-Templat bezog und die tatsächliche Konzentration des gebildeten Polymers nicht berücksichtigte.

Mit dem verwendeten modularen Ansatz konnte mit relativ geringem Aufwand eine Vielzahl unterschiedlicher Kohlenhydrat-Epitope präsentiert werden. Obwohl der PNA•DNA-Duplex in seiner Struktur klar definiert war, betonten die Autoren, dass die Linker zwischen den Kohlenhydrat-Liganden und dem PNA•DNA-Duplex einen gewissen Grad an Flexibilität einführten. Zum Beispiel beruhte der Abstand zwischen den Kohlenhydrat-Liganden in Komplex **11** nahezu vollständig auf den Linkern und betrug fast 39 Å. Da der PNA•DNA-Duplex an seinen Enden atmete, führte die Verwendung terminal modifizierter PNA-Oligomere (siehe Abbildung 8) ebenfalls zu weniger exakt definierten Abständen zwischen den präsentierten Kohlenhydrat-Liganden. Durch

Verwendung kürzerer Linker einerseits und Anbringung der Liganden an interne Positionen andererseits, könnte die Präzision der Ligandenpräsentation deutlich erhöht werden. Wenn-
gleich bereits gezeigt werden konnte, dass Einzelstrangbrüche einen Einfluss auf die Duplex-
struktur haben können,^[70] wurde dieser in beiden Arbeiten vernachlässigt. Tatsächlich erlaubt
die Einführung von Einzelstrangbrüchen und/oder -abschnitten eine nahezu stufenlose Modu-
lation der Flexibilität des PNA•DNA-Gerüsts.

3. ZIELSETZUNG

Die Natur bedient sich oft der Multivalenz um schwache Wechselwirkungen wie die zwischen Kohlenhydraten und Lektinen zu verstärken.^[6] Die zugrunde liegenden Mechanismen werden aber nur langsam aufgeklärt. Insbesondere die Überlagerung mehrerer Effekte macht eine Aufschlüsselung in einzelne Beiträge schwierig. Umso wichtiger ist es, die dabei verwendeten Werkzeuge, d. h. die eingesetzten Bindungspartner, so präzise wie möglich zu gestalten. Neben der Anzahl an präsentierten Liganden hat deren exakte Positionierung im Raum ebenfalls großen Einfluss.^[7] Beide Parameter werden maßgeblich durch das Gerüst, an das die Liganden befestigt sind, beeinflusst. Die Doppelhelix von Nukleinsäuregerüsten erlaubt die Einstellung von beiden Parametern mit hoher Präzision. Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines molekularen Lineals, das zur genauen Präsentation mehrerer Kohlenhydrat-Liganden in definierter Anzahl und räumlicher Anordnung einen PNA•DNA-Duplex als Gerüst nutzt. Durch Verwendung eines modularen Ansatzes soll der synthetische Aufwand gering gehalten werden (siehe Abbildung 9). Ein langer DNA-Einzelstrang dient als Templat und codiert vier Anticodons. Kurze, teilweise mit Liganden markierte, PNA-Einzelstränge fungieren als Codons, welche mit den Anticodons hybridisieren. Je nach Sequenz bildet sich ein anderer PNA•DNA-Duplex aus. Die Anzahl und die räumliche Anordnung der Liganden werden durch Sequenzvariation des DNA-Templats eingestellt. Neben der Variation des Abstands zwischen den Liganden (Abbildung 9A), kann zudem die Flexibilität der erzeugten Komplexe durch Einführung von Einzelstrangbrüchen und -abschnitten variiert werden (Abbildung 9B).

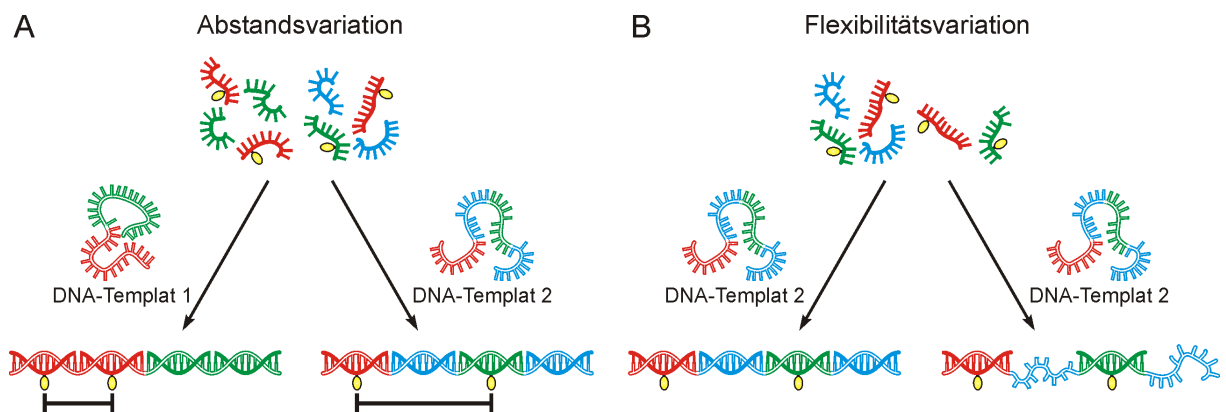


Abbildung 9: Variation des Abstands (A) zwischen den präsentierten Liganden sowie der Flexibilität (B) der modular aufgebauten Kohlenhydrat-PNA•DNA-Komplexe.

Unter Verwendung eines Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-basierten Bindungsassays soll zunächst die Genauigkeit und Vorhersagbarkeit dieses molekularen Lineals anhand der multivalenten Proteine *Erythrina cristagalli* Lektin (ECL), *Ricinus communis* Agglutinin (RCA₁₂₀) und Concanavalin A (ConA), deren Strukturen genau bekannt sind, überprüft werden. Im Fall von ECL

sollen zusätzlich ein Enzym-gekoppelter Lektin-Assay (ELLA) und ein Fluoreszenzpolarisations-Assay durchgeführt und die daraus erhaltenen Ergebnisse mit denen des SPR-basierten Assays verglichen werden, um so die Allgemeingültigkeit des Systems zu untersuchen. Anschließend soll das Werkzeug auf ein weniger gut charakterisiertes System angewendet werden: die Leukozytenadhäsionskaskade, genauer gesagt, die Wechselwirkung zwischen Selektinen und seinen Liganden. Als Ligand soll Sialyl-Lewis-X dienen, da dieses zwar nicht mit sehr hoher Affinität, dafür aber an alle drei Selektine bindet und folglich für L-, P- und E-Selektin gleichermaßen eingesetzt werden kann.

Die Fähigkeit der sLe^x-PNA•DNA-Komplexe, die Wechselwirkung zwischen Leukozyten und Endothelzellen zu inhibieren, soll zunächst in einem kompetitiven SPR-Assay, der das natürliche System artifiziell nachbildet, untersucht werden. Anschließend soll das Bindungsverhalten einiger repräsentativer Komplexe in einem zellbasierten Assay, d. h. unter physiologischen Bedingungen, studiert werden. Mittels beider Assays gilt es herauszufinden, ob die Wechselwirkung zwischen Leukozyten und Endothelzellen prinzipiell durch die gezielte räumliche Ausrichtung von mehreren Sialyl-Lewis-X-Liganden moduliert werden kann. Die erhaltenen Ergebnisse könnten von großem Nutzen in der Wirkstoffentwicklung sein. Ferner sollen, durch Variation der Linkerflexibilität zwischen den Liganden, Rückschlüsse über den Mechanismus der Selektin-sLe^x-Bindung erhalten werden, z. B. ob eine starre Verbrückung zwischen mehreren Liganden von Vorteil bei der gleichzeitigen Ausbildung mehrerer „catch“-Bindungen ist. Daraus sollen wiederum mögliche Eigenschaften des biologischen Systems abgeleitet werden, z. B. die Festigkeit mit der die Liganden in der endothelialen Membran verankert sind.

Für den Aufbau der multivalenten Kohlenhydrat-PNA•DNA-Komplexe müssen zunächst die Maleinimid-funktionalisierten Kohlenhydrate **16 – 18** hergestellt werden (siehe Abbildung 10). Außerdem muss das Thiol-modifizierte PNA-Monomer **19** synthetisiert werden. Nach Einbau in die PNA-Oligomere **20** sollen die Kohlenhydrate mittels Maleinimid-Kupplung daran gekuppelt werden. Hybridisierung der PNA-Oligomere **21** mit unterschiedlichen DNA-Templatsträngen liefert schließlich die multivalenten Kohlenhydrat-PNA•DNA-Komplexe (siehe Abbildung 9).

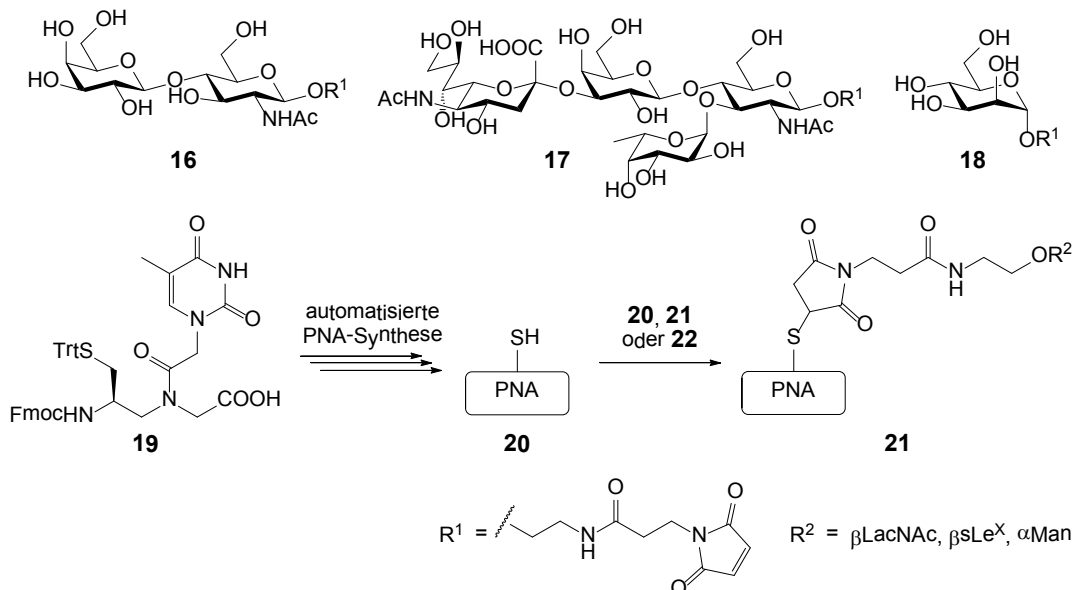


Abbildung 10: Darstellung der Kohlenhydrat-PNA-Konjugate **21**.

Im Anschluss soll das molekulare Lineal zur multivalenten Präsentation eines Aptamer, das hochaffin für L-Selektin ist, benutzt werden. Dabei sollen die gleichen Bindungsassays wie bei den sLe^X-PNA•DNA-Komplexen eingesetzt werden. Da das Aptamer eine wesentlich höhere Affinität für L-Selektin hat als Sialyl-Lewis-X, könnte durch einen Vergleich beider Liganden geklärt werden, inwiefern die Bindungsaffinität die Ausbildung von „catch“-Bindungen beeinflusst. Die Darstellung der multivalenten Aptamer-PNA•DNA-Komplexe soll, analog den Kohlenhydrat-PNA•DNA-Komplexen, durch Kupplung des Maleinimid-funktionalisierten Aptamers **22** an die Thiol-haltigen PNA-Oligomere **20** (siehe Abbildung 11) und Hybridisierung der erhaltenen Aptamer-PNA-Konjugate **23** mit komplementären DNA-Templatsträngen erfolgen.

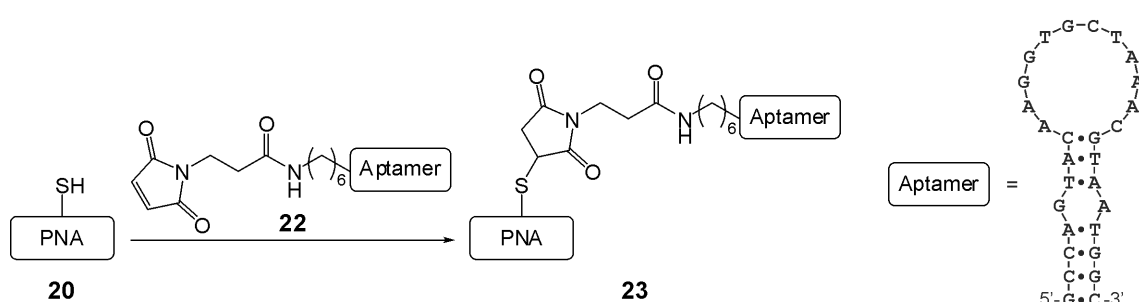


Abbildung 11: Darstellung der Aptamer-PNA-Konjugate **23**.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Synthese der Kohlenhydrat-Liganden

Während der Arbeit wurden die Kohlenhydrat-Liganden *N*-Acetyllactosamin (LacNAc), Sialyl-Lewis-X (sLe^x) und Mannose (Man) hergestellt und an PNA-Oligomere gekuppelt. Für die Kuppelung wurde am anomeren Zentrum des jeweiligen reduzierenden Zuckers ein Aminoethyl-Linker angebracht (siehe Abbildung 12). Zur Vermeidung von Nebenreaktionen war die Amino-Gruppe im Fall von LacNAc und sLe^x mit einer Benzyloxycarbonyl (Cbz)-Gruppe geschützt. Ein zusätzlicher Vorteil dabei war, dass die Cbz-Schutzgruppe die Polarität der Glykoside signifikant verringerte und so deren Reinigung mittels Umkehrphasenchromatographie ermöglichte. Nach der Synthese konnte die Schutzgruppe selektiv durch Hydrogenolyse abgespalten werden und die deblockierte Amino-Gruppe stand wieder für Funktionalisierungen zur Verfügung.

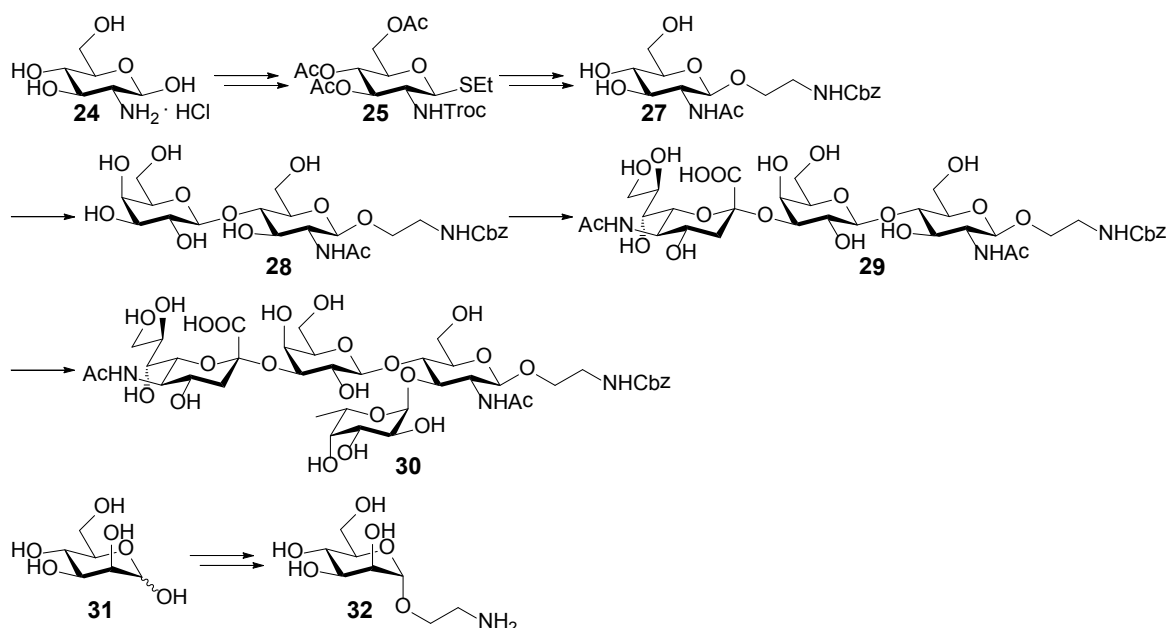


Abbildung 12: Übersicht über die Synthese der Kohlenhydrat-Liganden.

Ausgehend vom Glucosamin **24** wurde zunächst der reaktive Thioglykosyldonor **25** hergestellt. Nach Umsetzung mit *N*-Cbz-Aminoethanol (**26**), gefolgt von einigen Schutzgruppenmanipulationen, wurde das glykosylierte *N*-Acetylglucosamin **27** erhalten. Der darauffolgende Aufbau zum Disaccharid **28** und anschließend zum Tetrasaccharid **30** erfolgte in drei aufeinanderfolgenden, chemoenzymatischen Glykosylierungen. Vorteile der chemoenzymatischen gegenüber einer „konventionellen“ Synthese sind hohe Stereoselektivitäten und Ausbeuten sowie die Vermeidung von aufwendigen und zeitintensiven Schutzgruppenmanipulationen. Während die eingesetzte Galactosyltransferase kommerziell erhältlich war, wurden die Sialyl- und Fucosyl-

transferase rekombinant von Kooperationspartnern hergestellt. Neben den Enzymen waren auch die Glykosylakzeptoren UDP-Galactose **33**, CMP-Neu5Ac **34** und GDP-Fucose **35** notwendig. CMP-Neu5Ac **34** konnte chemoenzymatisch *in situ* generiert werden, UDP-Galactose **33** und GDP-Fucose **35** wurden hingegen separat synthetisiert. Für das Mannosid **32** wurde die Glykosylierung mit Bromethanol durchgeführt und das Bromid anschließend in ein Amin überführt.

4.1.1 Synthese von UDP-Galactose und GDP-Fucose

UDP-Galactose **33** und GDP-Fucose **35** wurden nach einer Vorschrift von Wittmann *et al.* hergestellt.^[81] Die Synthese basierte auf der Kupplung eines Glykosylphosphats mit einem aktivierten Nukleosidmonophosphat, in diesem Fall Phosphomorpholidat, unter Katalyse von 1*H*-Tetrazol (siehe Abbildung 13). Uridin-5'-monophosphomorpholidat **38** und Guanosin-5'-monophosphomorpholidat **39** wurden durch Erhitzen des Nucleosid-5'-monophosphats **36** bzw. **37** und Morpholin unter langsamer Zugabe von DCC in 68 – 69 % erhalten.^[82]

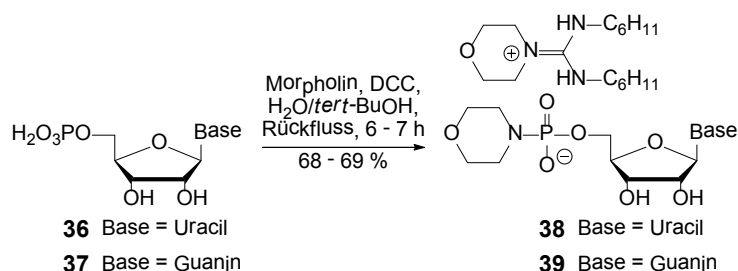


Abbildung 13: Synthese von Uridin-5'-monophosphomorpholidat **38** und Guanosin-5'-monophosphomorpholidat **39**.

Während α -D-Galactose-1-phosphat **40** preisgünstig erhältlich war, wurde β -L-Fucose-1-phosphat **41** aus Kostengründen selbst hergestellt (siehe Abbildung 14).^[83-85] Zunächst wurden die Hydroxylgruppen von L-Fucose (**42**) quantitativ mit Benzoylchlorid in Pyridin benzyliert. Die perbenzylierte Fucose **43** wurde anschließend mit Phosphortribromid in das Fucosylbromid **44** überführt, welches aufgrund seiner geringen Stabilität sofort in einer Koenigs-Knorr-Reaktion

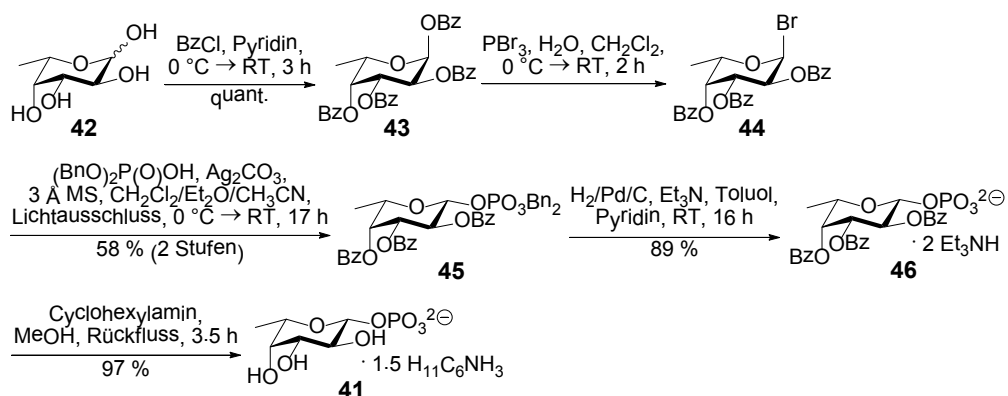


Abbildung 14: Synthese von β -L-Fucose-1-phosphat **41**.

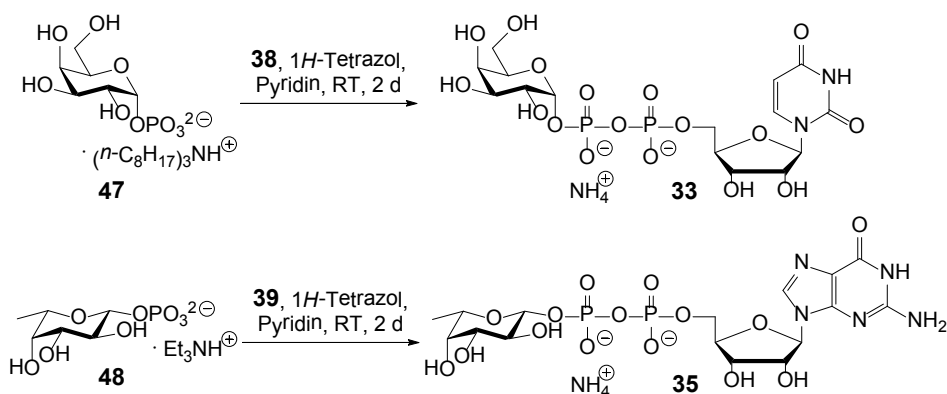


Abbildung 15: Synthese von UDP-Galactose **33** und GDP-Fucose **35**.

zum vollständig geschützten Fucose-1-phosphat **45** umgesetzt wurde. Die Gesamtausbeute über beide Stufen betrug 58 %. Danach wurden die Benzylgruppen hydrogenolytisch und die Benzoylgruppen durch Erhitzen in einem 1:1-Gemisch aus Cyclohexylamin und Methanol abgespalten.

Für die Kupplung mit den Phosphomorpholidaten **38** und **39** (siehe Abbildung 15) mussten die Glykosylphosphate **40** und **41** zur Erhöhung der Löslichkeit und Reaktivität^[81] zuvor mittels Kationenaustauscher in das Trioctylammonium-Salz **47** und das Triethylammonium-Salz **48** überführt werden. Die Kupplung wurde unter wasserfreien Bedingungen in Pyridin durchgeführt. Nach einer Kupplungszeit von 2 Tagen wurde das Reaktionsgemisch aufgearbeitet. Für die Reinigung wird in der Literatur eine Größenausschlusschromatographie über ein Polyacrylamidgel (Bio-Gel P-2) empfohlen.^[81] Im Fall von UDP-Galactose **33** konnte damit nur eine unvollständige Trennung erreicht werden. Zu den Verunreinigungen zählten laut massenspektrometrischer Analyse Uridin-5'-monophosphat (UMP) und Diuridintriphosphat. Alternativ zu dieser Reinigung wurde eine Anionenaustauschchromatographie mit Agarose (Q Sepharose™ Fast Flow) als stationärer Phase und Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer als mobiler Phase durchgeführt. Wenngleich die Trennleistung in diesem Fall besser war, konnte die synthetisierte GDP-Fucose **35** nicht vollständig von den Nebenprodukten befreit werden. Wie aus Kapitel 4.1.2 zu entnehmen ist, konnten auch die Rohprodukte beider Glykosylphosphonukleoside (**33** und **35**) in der chemoenzymatischen Synthese von Sialyl-Lewis-X **30** eingesetzt werden und sowohl die Galactosylierung als auch die Fucosylierung mit hohen Ausbeuten durchgeführt werden.

4.1.2 Synthese des Sialyl-Lewis-X-Liganden

Ziel der Synthese war zunächst die Darstellung des glykosylierten *N*-Acetylglucosamins **27**, welches den Grundkörper für den nachfolgenden chemoenzymatischen Aufbau des Tetrasaccharids Sialyl-Lewis-X **30** darstellte. Obwohl die Synthese in der Literatur mit einem ähnlichen Akzeptor beschrieben ist,^[86] konnte das tetraacetylierte Glykosid **54** nicht durch eine

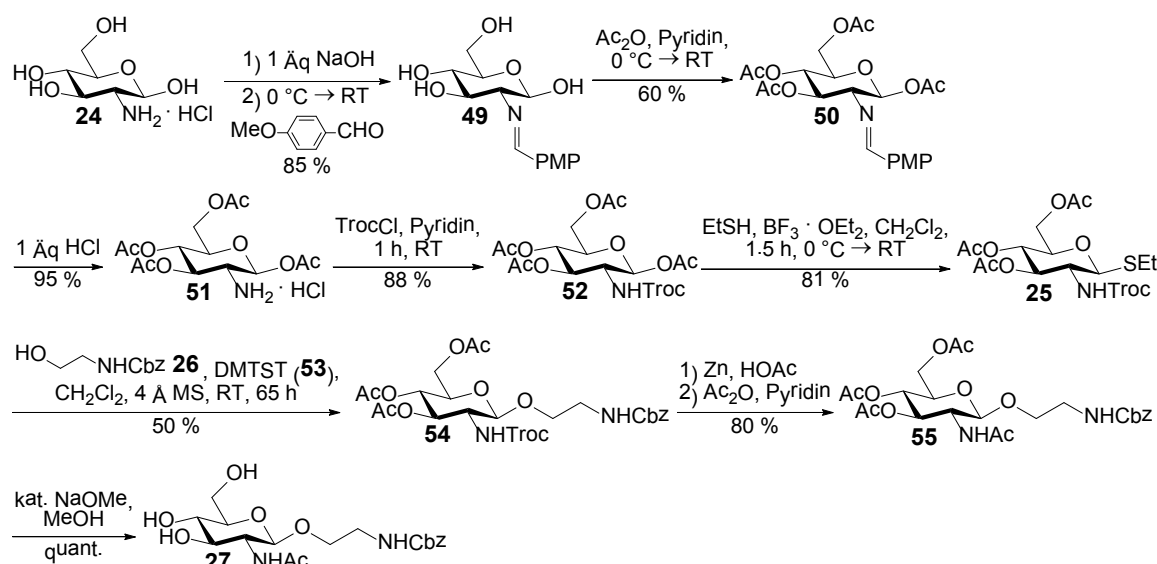


Abbildung 16: Synthese des *N*-Acetylglucosaminids **27**.

BF_3 -vermittelte Glykosylierung von peracetyliertem Glucosamin mit *N*-Cbz-geschütztem Aminoethanol (**26**) erhalten werden. Folglich wurde auf eine andere Syntheseroute ausgewichen (siehe Abbildung 16).^[87-89] Zu Beginn wurde die Amino-Funktion von D-Glucosaminhydrochlorid (**24**) durch Umsetzung mit *p*-Anisaldehyd in das Imin **49** überführt. Nach erfolgter Acetylierung der Hydroxylgruppen mit Essigsäureanhydrid in Pyridin wurde das Imin **50** sauer gespalten. Die dabei frei gewordene Amino-Gruppe wurde anschließend mit einer Trichloroxycarbonyl (Troc)-Gruppe geschützt. Die Troc-Schutzgruppe wurde eingesetzt, da diese zum einen, aufgrund eines Nachbargruppeneffekts, bei Glykosylierungen zum β -Anomer führt und zum anderen leicht reaktiv abgespalten werden kann.^[88] Der Glykosyldonor **52** wurde BF_3 -vermittelt mit Ethan-thiol in das aktivierte Thioglykosid **25** überführt, welches anschließend die Glykosylierung mit *N*-Cbz-2-aminoethanol (**26**) ermöglichte. Die Reaktion wurde in Gegenwart von 4 Å Molsieb durchgeführt, unter Verwendung von frisch hergestellten Dimethyl(methylthio)sulfoniumtri-fluormethansulfonat (DMTST, **53**) als Aktivator.^[90] Nach 65 Stunden bei Raumtemperatur wur-den 50 % des Glykosids **54** erhalten. Anschließend wurde die Troc-Schutzgruppe reaktiv (Zink, Essigsäure) entfernt und die deblockierte Amino-Funktion mit Essigsäureanhydrid in Pyridin acetyliert. Im letzten Schritt wurden die blockierten Hydroxylgruppen von **55** unter Zemplén-Bedingungen deacetyliert.^[91]

Ausgehend vom Monosaccharid **27** wurde das Tetrasaccharid **30** in drei aufeinanderfolgenden chemoenzymatischen Glykosylierungen synthetisiert (siehe Abbildung 17). In der ersten kam kommerziell erhältliche β -1,4-Galactosyltransferase aus Kuhmilch zum Einsatz und UDP-Galac-tose **33** fungierte als Akzeptor. Diese wurde wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben hergestellt und enthielt, wie bereits dort erläutert, unter anderem UMP als Verunreinigung. UMP inhibiert, ebenso wie während der Reaktion gebildetes UDP, die Galactosylierung und führt zu einer verminderten

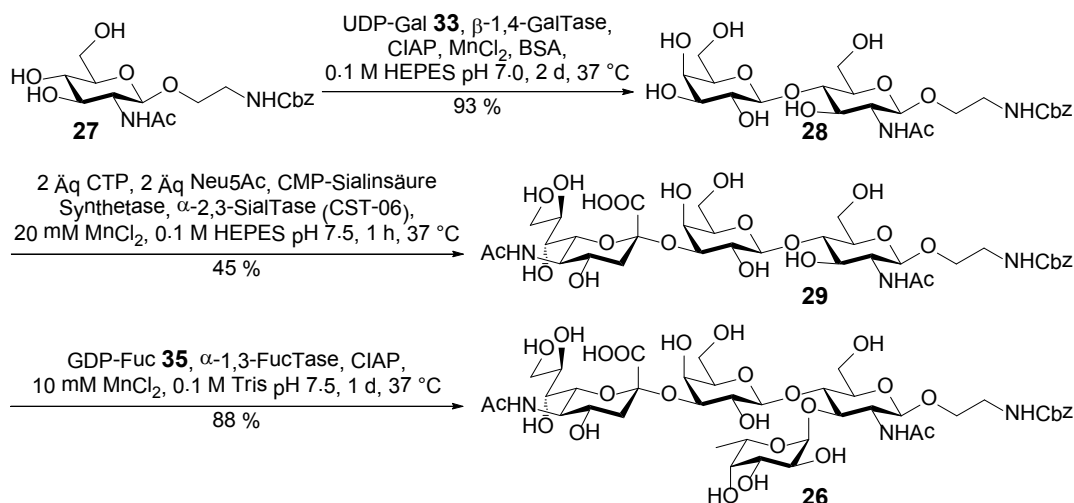


Abbildung 17: Synthese von glykosylierten Sialyl-Lewis-X **26**.

Produktbildung.^[92] Durch Zugabe von alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP), welches diese Phosphate abbaut, konnte diesem Umstand jedoch begegnet werden.^[93] Unter den verwendeten Reaktionsbedingungen war es zudem möglich, die UDP-Galactose **33** in großem Überschuss einzusetzen, ohne Abstriche bei der Ausbeute in Kauf nehmen zu müssen. Nach zwei Tagen bei 37 °C war der Reaktionsumsatz laut HPLC-Analyse nahezu quantitativ. Die hydrophobe Cbz-Gruppe erlaubte eine Aufreinigung mittels Umkehrphasenchromatographie. Das Reaktionsgemisch wurde direkt auf eine Sep-Pak® C18-Säule gegeben, die Nebenprodukte mit Wasser eluiert und das Produkt **28** durch Elution mit Methanol in reiner Form in 93 % Ausbeute erhalten.

Bei der zweiten chemoenzymatischen Glykosylierung (siehe Abbildung 17) wurde rekombinante α -2,3-Sialyltransferase eingesetzt, die von Dr. Warren Wakarchuk (National Research Council Canada, Kanada) zur Verfügung gestellt wurde. Das verwendete Konstrukt CST-06 wurde aus dem Stamm OH4384 von *Campylobacter jejuni* exprimiert und war am N-Terminus mit dem Maltose-bindenden Protein von *Escherichia coli* fusioniert.^[94-95] Im Gegensatz zu UDP-Galactose **33** und GDP-Fucose **35** wurde CMP-*N*-Acetylneuraminsäure **34** chemoenzymatisch *in situ* generiert. Das kommerziell erhältliche Enzym CMP-Sialinsäure Synthetase erzeugt aus Cytidin-5'-triphosphat (CTP) und Sialinsäure CMP-*N*-Acetylneuraminsäure **34** unter Abspaltung von Pyrophosphat. Obwohl das bei der Sialylierung erzeugte Nebenprodukt Cytidin-5'-monophosphat (CMP) inhibierend wirkt,^[96] konnte keine Phosphatase zugesetzt werden, da dies ebenfalls zum Abbau von CTP geführt hätte. Des Weiteren musste der pH-Wert des Reaktionsgemischs nach Zugabe von CTP und Sialinsäure mit Natronlauge wieder auf pH 7.5 eingestellt werden, da bekannt ist, dass CMP-Neu5Ac bei pH < 7.4 hydrolysiert.^[97] Die Reaktion wurde nach einer Stunde bei 37 °C gestoppt, das Reaktionsgemisch über eine Sep-Pak® C18-Säule vorgereinigt und das Rohprodukt mittels semi-präparativer Umkehrphasen-HPLC gereinigt. Eine chromatographische Trennung

war jedoch nur möglich, wenn die mobile Phase 0.1 % Trifluoressigsäure (TFA) enthielt. Wurde die Chromatographie mit einer schwächeren Säure (0.1 % Ameisensäure) oder in Abwesenheit von Säure durchgeführt, wurde keine Trennung erzielt. Die Verwendung von TFA hatte jedoch zur Folge, dass beim anschließenden Entfernen des Lösungsmittels durch Gefriertrocknung der pH-Wert in der Produktfraktion derart stark abnahm, dass die neu geknüpfte glykosidische Bindung teilweise sauer hydrolysierte und das Edukt regeneriert wurde. Dies konnte jedoch umgangen werden, wenn das Lösungsmittel vor der Gefriertrocknung via Sep-Pak® C18-Säule durch ein säurefreies ausgetauscht wurde. Nach erfolgter Reinigung wurde das Sialyl-*N*-acetyl-lactosaminid **29** in 45 % Ausbeute erhalten. Ein Grund für die geringe Ausbeute könnte die, bereits oben erwähnte, inhibierende Wirkung von CTP und CMP sein. Durch eine Verlängerung der Reaktionszeit konnte die Ausbeute nicht gesteigert werden, da es in diesem Fall vielmehr zu einer Hydrolyse von CMP-Neu5Ac durch die Sialyltransferase kam. Mehta *et al.* erreichten eine ähnlich niedrige Ausbeute bei Verwendung der gleichen Sialyltransferase, konnten diese jedoch durch erneute Zugabe von CTP, Sialinsäure, CMP-Sialinsäure Synthetase und Sialyltransferase erhöhen.^[98] Da dies jedoch mit einem erhöhten Verbrauch an Sialyltransferase einhergegangen wäre, wurde darauf verzichtet.

Die für die Fucosylierung (siehe Abbildung 17) notwendige *Helicobacter pylori* α -1,3-Fucosyltransferase war ebenfalls nicht kommerziell erhältlich und wurde von Chun-Hung Lin, Ph.D. (Academia Sinica, Taiwan) bereitgestellt.^[99] Der Akzeptor GDP-Fucose **35** wurde wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben hergestellt, war jedoch, wie UDP-Galactose **33**, verunreinigt. Durch Zugabe von Phosphatase zum Reaktionsgemisch wurden eventuell inhibierende Phosphate abgebaut. Im Gegensatz zur Galactosylierung, konnte GDP-Fucose jedoch nicht in beliebig großen Überschuss eingesetzt werden, weil hohe Konzentrationen an GDP-Fucose die Fucosylierung inhibieren.^[92] Da aufgrund der Verunreinigungen eine quantitative Aussage bezüglich der eingesetzten Stoffmenge an GDP-Fucose **35** nicht gemacht werden konnte, musste die optimale Menge an zugesetzter GDP-Fucose **35** in Vorexperimenten bestimmt werden. Dabei wurde die Fucosylierung mit unterschiedlichen Mengen an GDP-Fucose **35** durchgeführt und der Umsatz mittels HPLC-Analyse bestimmt. Anschließend konnte die Fucosylierung durchgeführt werden. Die Reaktionszeit betrug ein Tag. Aufgrund der Säurelabilität der Sialinsäure wurde das Reaktionsgemisch nach dem gleichen Protokoll gereinigt wie bei der Sialylierung. Das Tetrasaccharid **30** wurde in 88 % Ausbeute erhalten.

4.1.3 Synthese des Mannose-Liganden

D-Mannose (**31**) wurde zu Beginn vollständig mit Essigsäureanhydrid in Pyridin acetyliert (siehe Abbildung 18). Das erhaltene Anomerengemisch der peracetylierten D-Mannose (**56**) wurde in einer BF₃-vermittelten Glykosylierung mit 2-Bromethanol selektiv zum α -Glykosid **57** umgesetzt.

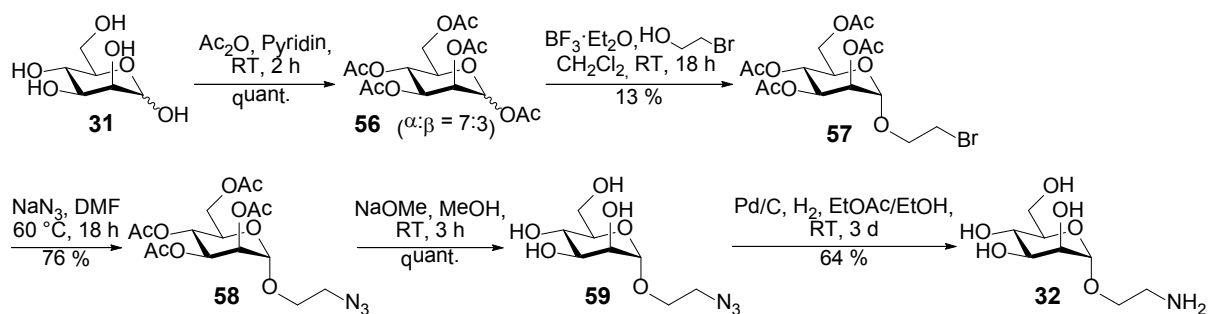


Abbildung 18: Synthese von D-Mannose mit Aminoethyl-Linker (**32**).

Da das Edukt **56** und das Produkt **57** ähnliche Retentionszeiten aufwiesen, konnten nur 13 % des Glykosids **57** durch einfache Säulenchromatographie abgetrennt werden. Auf eine Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde verzichtet, wenngleich Hayes *et al.* 41 % des Produktes isolieren konnten.^[100] Nach nukleophiler Substitution des Bromids **57** durch das Azid **58** wurden die Acetylgruppen unter Zemplén-Bedingungen entfernt. Der letzte Schritt stellte die hydrogenolytische Reduktion des Azids **59** dar. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnten 64 % des Amins **32** isoliert werden.^[100-101]

4.2 Synthese von Fluorescein-markierter Lactose

Der Großteil der Bindungsassays in dieser Arbeit konnte ohne chemische Modifikation der beteiligten Bindungspartner durchgeführt werden. Für den Fluoreszenzanisotropie-Assay (siehe Kapitel 4.8.3) war hingegen ein Referenz-Ligand, der mit einem Fluorophor markiert war, nötig, genauer gesagt, Fluorescein-markierte Lactose **67**.

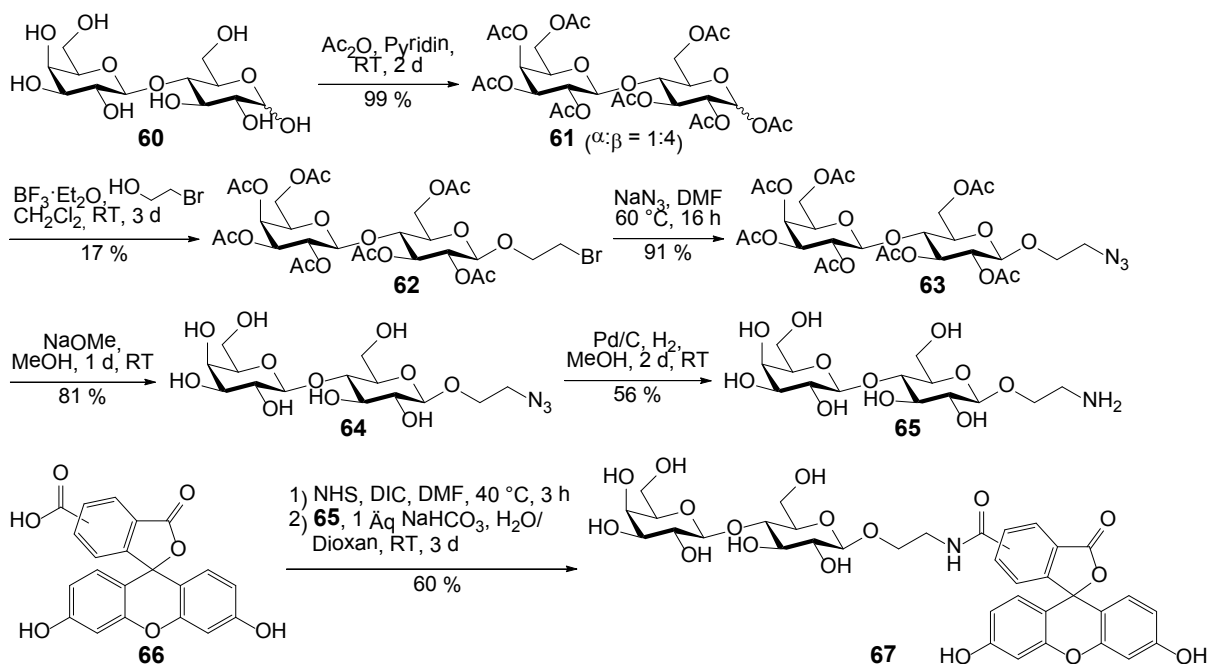


Abbildung 19: Synthese von Fluorescein-markierter Lactose **67**.

Die Synthese ist in Abbildung 19 gezeigt und wurde analog der des Aminoethyl-mannosids **32** (siehe Kapitel 4.1.3) durchgeführt. Im ersten Schritt wurde D-Lactose (**60**) mit Essigsäureanhydrid in Pyridin nahezu quantitativ zu peracetylierter D-Lactose (**61**) umgesetzt. Die nachfolgende Glykosylierung mit 2-Bromethanol am C1 erfolgte in Anwesenheit von Bortrifluorid und lieferte stereoselektiv das β -Anomer. Da eine Trennung von Edukt **61** und Produkt **62** nur teilweise mittels einfacher Säulenchromatographie möglich war,^[102] konnten lediglich 17 % des Glykosids **62** isoliert werden. Anschließend wurde das Bromid **62** durch nukleophile Substitution in das Azid **63** überführt und, nach Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppen mit Natriummethanolat, hydrogenolytisch zum Amin **65** reduziert. Die Amino-Gruppe ermöglichte dann die Modifikation mit Fluorescein. Dazu wurde die Carboxylgruppe von 5(6)-Carboxyfluorescein (**66**) durch Reaktion mit *N*-Hydroxysuccinimid und *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid bei 40 °C aktiviert und der erhaltene NHS-Aktivester mit dem Aminoethylactosid **65** umgesetzt. Die Kupplung wurde in Gegenwart von einem Äquivalent Natriumhydrogencarbonat durchgeführt. Nach drei Tagen Kupplungszeit wurden 60 % Lac~FAM **67** erhalten.

4.3 Synthese des rückgratmodifizierten PNA-Monomers

Die Modifikation von PNA-Monomeren ist sowohl an der Nukleobase als auch am Rückgrat möglich. Bei der Einführung von zusätzlichen Seitenketten am Aminoethylglycin-Rückgrat ist zu beachten, dass die räumliche Ausrichtung des erzeugten Stereozentrums großen Einfluss auf die helikale Stabilität bei Hybridisierung mit komplementärer DNA hat. Da eine Modifikation an der C5-Position des Rückgrats mit L-Konfiguration den größten positiven Einfluss hat,^[103] wurde L-Cystein in das Rückgrat eingebaut. Die Darstellung des rückgratmodifizierten PNA-Monomers **19** erfolgte nach einer von Dose und Seitz entwickelten Syntheseroute (siehe Abbildung 20).^[104] Zu Beginn wurde geschütztes (*R*)-Cystein **68** zu 70 % in das Weinrebamid **69** überführt. Die Aktivierung der Carbonsäure erfolgte durch Reaktion mit Chlorameisensäureisobutylester in das gemischte Anhydrid. Wegen der Fmoc-geschützten Amino-Funktion wurde die anschließende Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid bei -75 °C durchgeführt.^[105] Laut Dünnschichtchromatographie bildete sich während der Reaktion nur ein Produkt. Nachdem überschüssiges Lithiumaluminiumhydrid mit Wasser neutralisiert worden war, wurde die Reaktionsmischung unter vermindertem Druck eingeengt, wobei es zur partiellen Zersetzung kam. Weil die Zersetzungsprodukte nicht mittels Säulenchromatographie abgetrennt werden konnten, wurde das Rohprodukt direkt mit Natriumcyanoborhydrid und Glycinmethylester reduktiv aminiert. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde der Aminoethylglycinmethylester **70** in 39 % über zwei Stufen erhalten.

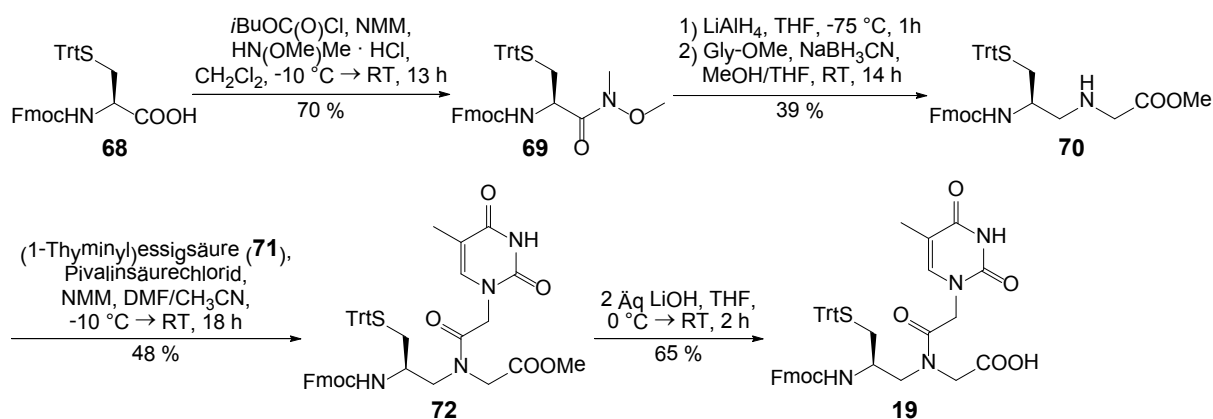


Abbildung 20: Synthese des rückgratmodifizierten PNA-Monomers **19**.

Bei der Kupplung der Nukleobase **71** an das Rückgrat wurde diese zunächst mit Pivalinsäurechlorid aktiviert, bevor das sekundäre Amin **70** zugeben wurde. Nach 18 Stunden Reaktionszeit wurde das Kupplungsprodukt **72** als Rotamerengemisch in 48 % Ausbeute erhalten. Im letzten Schritt wurde der Methylester **72** basisch verseift. Wegen der Basenlabilität der 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppe einerseits und dem aciden Pyrimidin-Proton andererseits, wurden genau zwei Äquivalente Lithiumhydroxid zugegeben. Des Weiteren musste bei der sauren Aufarbeitung darauf geachtet werden, dass der pH-Wert der Lösung nicht kleiner als drei war, da es sonst zur Abspaltung der Triphenylmethyl (Trt)-Schutzgruppe gekommen wäre. Die Carbonsäure **19** wurde in 65 % Ausbeute erhalten.

4.4 PNA-Oligomersynthese

PNA-Oligomere wurden mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc/Bhoc-Strategie hergestellt.^[106] Sämtliche Oligomere wurden auf einem mit Fmoc-Lysin beladenen NovaSyn® TGR-Harz aufgebaut. Neben den kommerziell erhältlichen PNA-Monomeren für die vier Nukleobasen wurde das rückgratmodifizierte PNA-Monomer **19** aus Kapitel 4.3 in die Oligomere eingebaut. Jeder Syntheszyklus (siehe Abbildung 21) begann mit der Deblockierung des Fmoc-geschützten N-Terminus durch Behandlung mit Piperidin in DMF. Anschließend wurde die Carboxylgruppe des N-Fmoc-geschützten PNA-Monomers durch Behandlung mit HCTU aktiviert. Bei Zugabe des voraktivierten PNA-Monomers zum Harz kam es zur Kupplung. Der Syntheszyklus endete mit der Blockierung nicht umgesetzter Amino-Gruppen durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid und 2,6-Lutidin in DMF. Dies verhinderte das Auftreten von Deletionssequenzen. Bis zum zehnten Monomer wurden Einfachkupplungen, danach Doppelkupplungen und für die letzten beiden Monomere in der Sequenz Dreifachkupplungen durchgeführt. Abweichend davon wurde das modifizierte PNA-Monomer **19** sowie das darauf folgende Monomer ebenfalls doppelt gekuppelt. Nach Aufbau der PNA-Sequenz wurde die N-terminale Fmoc-Gruppe mit Piperidin in DMF entfernt und das Oligomer durch

Zugabe von TFA vom Harz abgespalten. Im Fall der Thiol-modifizierten PNA-Oligomere enthielt die Abspaltungslösung zusätzlich zu Triisopropylamin auch Ethandithiol zum Abfangen reaktiver Teilchen. Danach wurden die 13 Nukleotide langen PNA-Oligomere **73** – **79** mittels präparativer Umkehrphasen-HPLC gereinigt und konnten in 9 – 17 % Ausbeute isoliert werden.

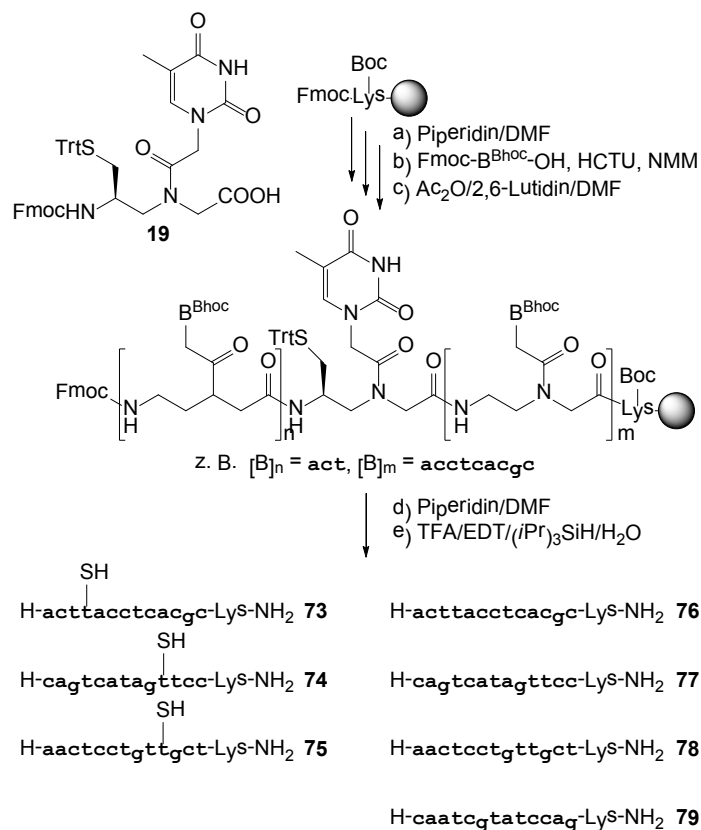


Abbildung 21: Festphasenpeptidsynthese der PNA-Oligomere **73** – **79**.

Um etwaige Nebenreaktionen, insbesondere Dimerisierung, zu verhindern, wurden die Thiolhaltigen PNA-Oligomere **73** – **75** stets in gefriergetrockneter Form bei -20 °C aufbewahrt. Bei Verwendung wurden diese in frisch entgastem Wasser gelöst, die entsprechende Menge abgenommen und der Rest sofort wieder lyophilisiert. Auf diese Weise waren die Thiolhaltigen PNA-Oligomere **73** – **75** selbst bei mehrmaligem Lösen und Gefriertrocknen, über Monate stabil.

Insgesamt wurden PNA-Oligomere mit vier verschiedenen Sequenzen hergestellt: **76** – **79**. Die ersten drei wurden, zusätzlich zur unmodifizierten Variante, auch als Thiolhaltige Variante hergestellt (**73** – **75**). **73** trug die Thiol-Modifikation nahe dem N-Terminus an der zehnten Position, **74** hingegen nahe dem C-Terminus an der vierten Position. **75** besaß zwar eine andere Sequenz als **74**, trug die Thiol-Modifikation jedoch an der gleichen Position wie **74**.

4.5 Synthese der Kohlenhydrat-PNA-Konjugate

Bevor die in Kapitel 4.1.2 und 4.1.3 hergestellten Kohlenhydrate an die Thiol-modifizierte PNA-Oligomere gekuppelt werden konnten, wurden diese mit einem Maleinimid funktionalisiert (siehe Abbildung 22). Im Fall von *N*-Acetyllactosamin wurde zunächst die Cbz-Schutzgruppe von **28** hydrogenolytisch entfernt. Die Aminoethyl-funktionalisierten Kohlenhydrate **80** und **32** wurden mit einem Äquivalent des NHS-Aktivesters von 3-Maleinimidpropansäure (**81**) umgesetzt, wobei die Reaktion in Wasser/Dioxan in Gegenwart von einem Äquivalent Natriumhydrogencarbonat durchgeführt wurde. Die anschließende Maleinimidkupplung wurde bei pH 6.5 durch-

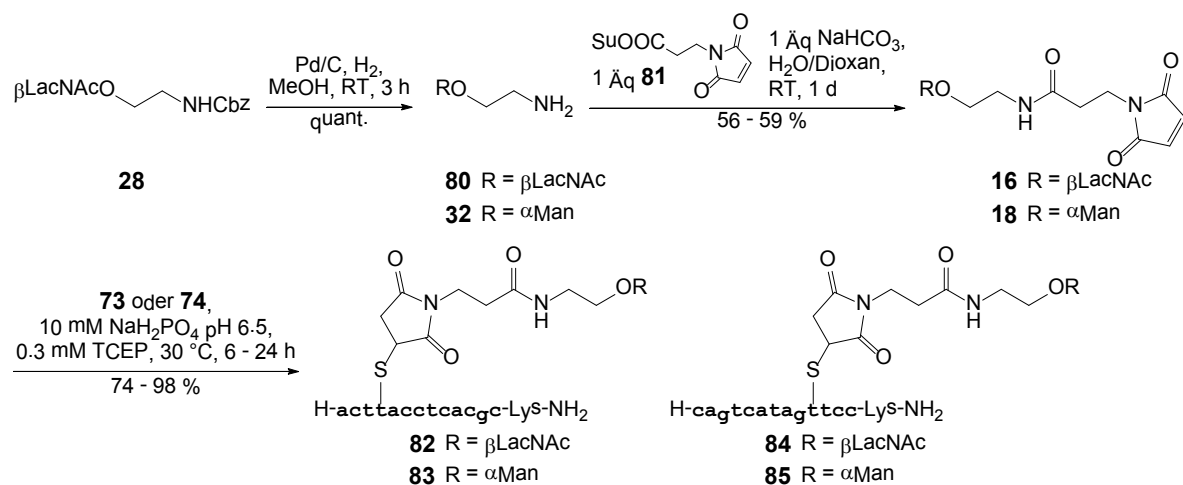


Abbildung 22: Synthese der LacNAc- und Man-PNA-Konjugate **82** – **85**.

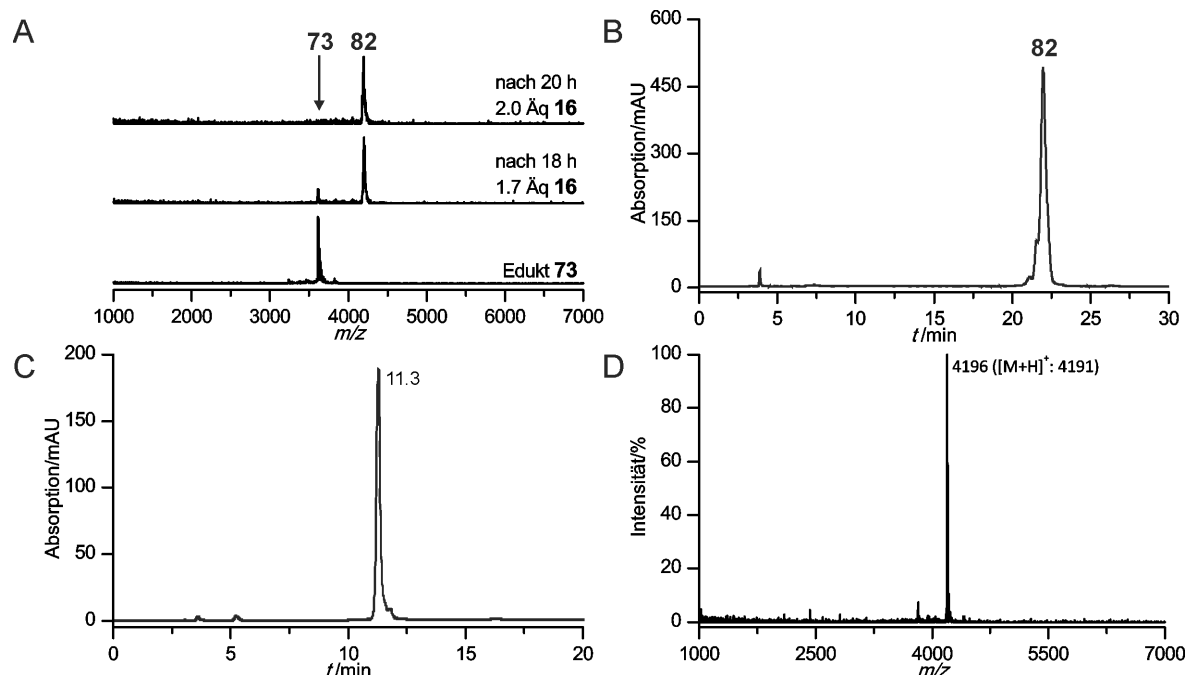


Abbildung 23: A) Reaktionsverfolgung der Synthese des LacNAc-PNA-Konjugats **82** mittels MALDI-Massenspektrometrie sowie B) das Chromatogramm der präparativen HPLC-Reinigung (3→17 % B1 in 30 min, Säule 7, λ = 260 nm). C) HPLC-Chromatogramm (3→30 % B1 in 20 min, Säule 1, λ = 260 nm) und D) MALDI-Massenspektrum des isolierten LacNAc-PNA-Konjugats **82**.

geführt. Unter diesen Bedingungen war die Dimerisierung der Thiol-haltigen PNA-Oligomere **73** und **74** durch Disulfidbildung minimiert, die Thiol-Gruppe aber dennoch ausreichend nukleophil für eine Michael-Addition an das Maleinimid. Um dennoch *in situ* gebildete Disulfide zu reduzieren, wurde die Kupplung außerdem in Gegenwart von TCEP durchgeführt, wobei die Konzentration an TCEP mit 0.3 mM niedrig war, da TCEP ebenfalls mit Maleinimiden reagieren kann.^[107-108] Die Thiol-haltigen PNA-Oligomere **73** und **74** wurden mit einem Überschuss an Maleimido-*N*-acetyllactosaminid **16** oder –mannosid **18** versetzt. Weil sich Edukt- und Produkt-PNA nur unzureichend mittels Umkehrphasen-HPLC voneinander trennen ließen, wurde so viel Maleinimid zugegeben, bis das Edukt nicht mehr mittels MALDI-Massenspektrometrie in der Reaktionslösung nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 23A). Nach chromatographischer Reinigung (siehe Abbildung 23B) wurden die LacNAc- und Man-markierten PNA-Oligomere **82** – **85** in reiner Form in 74 – 98 % Ausbeute erhalten (siehe Abbildung 23C – D).

Die Synthese der sLe^x-PNA-Konjugate erfolgte, bis auf zwei Abweichungen, analog der Synthese der LacNAc- und Man-PNA-Konjugate (siehe Abbildung 24). Zum einen wurde die Thiol-modifizierte PNA **74** durch **75** ersetzt (der Grund dafür wird in Kapitel 4.7 erläutert) und zum anderen wurde die Einführung der Maleimido-Funktionalität unter anderen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Grund dafür war die Tatsache, dass es bei Durchführung der Reaktion in Wasser in Gegenwart von einem Äquivalent Natriumhydrogencarbonat zur vermehrten Bildung eines Produktes mit der Masse [M + 18] kam. Dieser Massenunterschied entspricht exakt dem eines Wassermoleküls. Die Identität der neuen Spezies wurde nie geklärt, eine plausible Erklärung könnte jedoch der Angriff eines Hydroxid-Ions an den Michael-Akzeptor sein. Untermuert wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass das Nebenprodukt keine Reaktivität mehr gegenüber Thiol-modifizierter PNA aufwies. Des Weiteren hing die Bildung des Nebenprodukts vom pH-Wert ab: je höher der pH-Wert war, desto schneller bildete sich das Nebenprodukt. Weil diese Nebenreaktion jedoch nur bei pH > 7 auftrat, wurde die Einführung des Maleinimids im Fall von Sialyl-Lewis-X in Puffer bei pH 6.5 durchgeführt. Um die verminderte Nukleophilie der Amino-

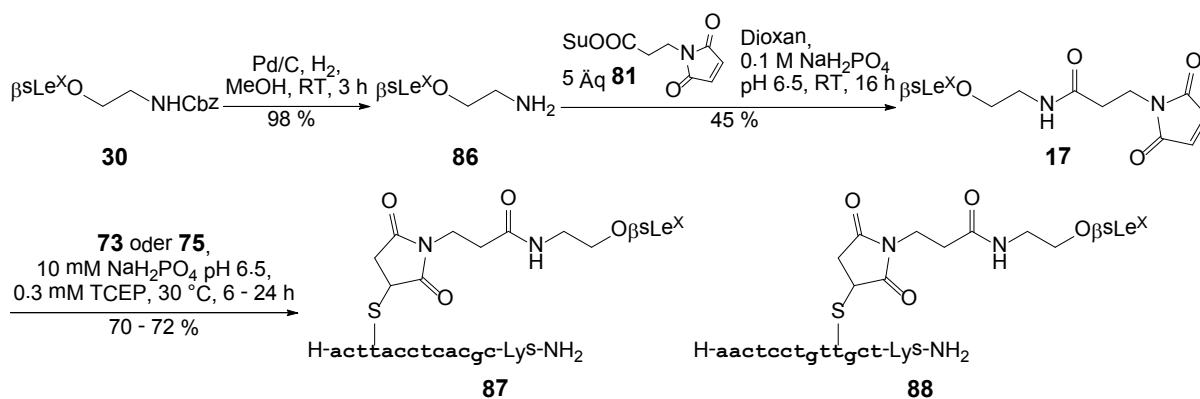


Abbildung 24: Synthese der sLe^x-PNA-Konjugate **87** und **88**.

Gruppe von **86**, die mit diesem niedrigen pH-Wert einherging, zu kompensieren, wurde der NHS-Aktivester von 3-Maleinimidpropansäure (**81**) im fünffachen Überschuss eingesetzt.

Die Reinigung des Maleinimids **17** erfolgte durch semi-präparative Umkehrphasen-HPLC. Dabei wurde auf die Erfahrungen bei der Reinigung von Sialyl-LacNAc **29** und Sialyl-Lewis-X **30** (siehe Kapitel 4.1.2) zurückgegriffen. Statt jedoch das TFA-haltige Lösungsmittel der Produktfraktion durch neutrales Methanol zu ersetzen, wurde stark verdünnte Ameisensäure in Wasser/Acetonitril genommen. Auf diese Weise war der pH-Wert der Lösung schwach sauer und sowohl die basische Hydratisierung des Maleinimids als auch die saure Hydrolyse der Sialinsäure wurden ausgeschlossen. Nach Gefriertrocknung wurden 45 % des Maleinimids **17** erhalten. Die Maleinimidkupplung von sLe^x an die Thiol-haltigen PNA-Oligomere **73** und **75** wurde unter analogen Reaktionsbedingungen wie zuvor bei LacNAc und Man durchgeführt. Die Reaktion wurde mittels MALDI-Massenspektrometrie verfolgt, wobei es teilweise zur Abspaltung von Sialinsäure kam. Da die Bildung dieses Zerfallsprodukts (in Abbildung 25A mit * gekennzeichnet) bei reduzierter Laserintensität nicht auftrat, konnte davon ausgegangen werden, dass das isolierte Produkt nicht zersetzt war. Nach der semi-präparativen Reinigung via Umkehrphasen-HPLC (siehe Abbildung 25B) wurde das TFA-haltige Lösungsmittel (obwohl in dem Produkt kein Maleinimid mehr vorhanden war) durch stark verdünnte Ameisensäure in Wasser/Acetonitril ausgetauscht, da es bei Verwendung eines neutralen Lösungsmittels (z. B. reinem Methanol) nicht zur Elution der

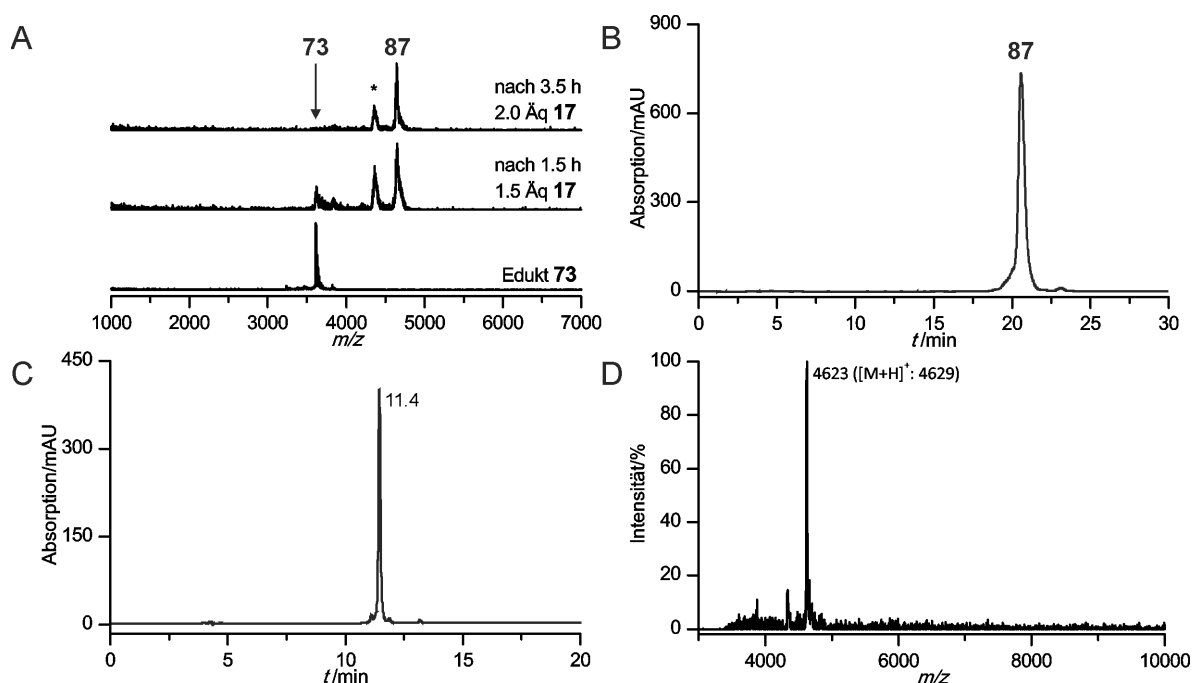


Abbildung 25: A) Reaktionsverfolgung der Synthese des sLe^x-PNA-Konjugats **87** mittels MALDI-Massenspektrometrie sowie B) das Chromatogramm der präparativen HPLC-Reinigung (3→17 % B1 in 30 min, Säule 7, $\lambda = 260$ nm). C) HPLC-Chromatogramm (3→30 % B1 in 20 min, Säule 1, $\lambda = 260$ nm) und D) MALDI-Massenspektrum des isolierten sLe^x-PNA-Konjugats **87**.

PNA von der Sep-Pak® C18-Säule kam. Die sLe^x-PNA-Konjugate **87** und **88** wurden in reiner Form in 70 – 72 % Ausbeute erhalten (siehe Abbildung 25C und D).

4.6 Synthese der Aptamer-PNA-Konjugate

Im ersten Schritt wurde der Aminohexyl-Linker des am 5'-Ende modifizierten Aptamers **89** mit einem Maleinimid funktionalisiert (siehe Abbildung 26). Um eine basische Hydratisierung der Maleimido-Funktion zu verhindern (vergleiche mit der Synthese von Maleimido-sLe^x **17**, Kapitel 4.5), wurde die Kupplung mit dem NHS-Aktivester von 3-Maleinimidpropansäure (**81**) bei pH 6.5 durchgeführt. Bei Verwendung von lediglich fünf Äquivalenten **81** verlief die Kupplung allerdings

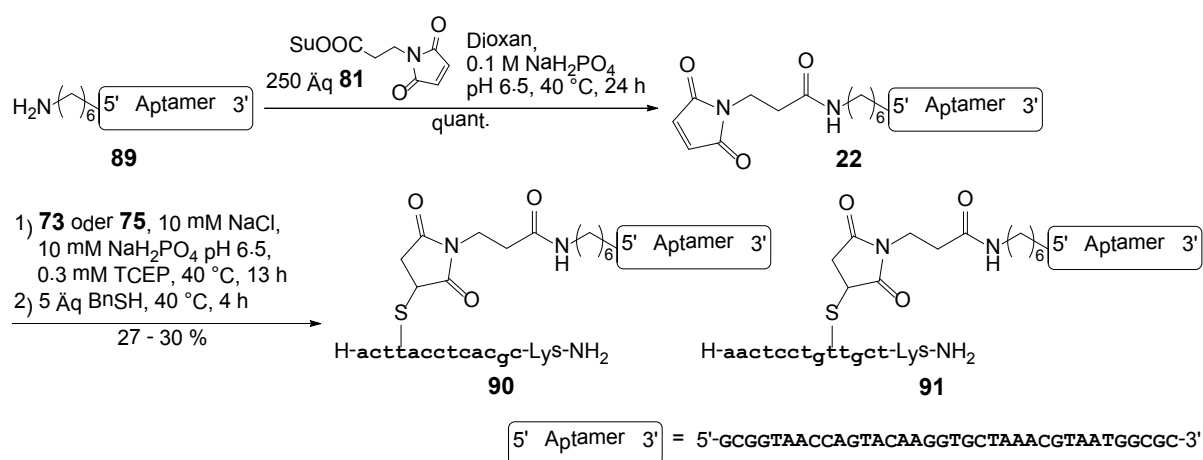


Abbildung 26: Synthese der Aptamer-PNA-Konjugate **90** und **91**.

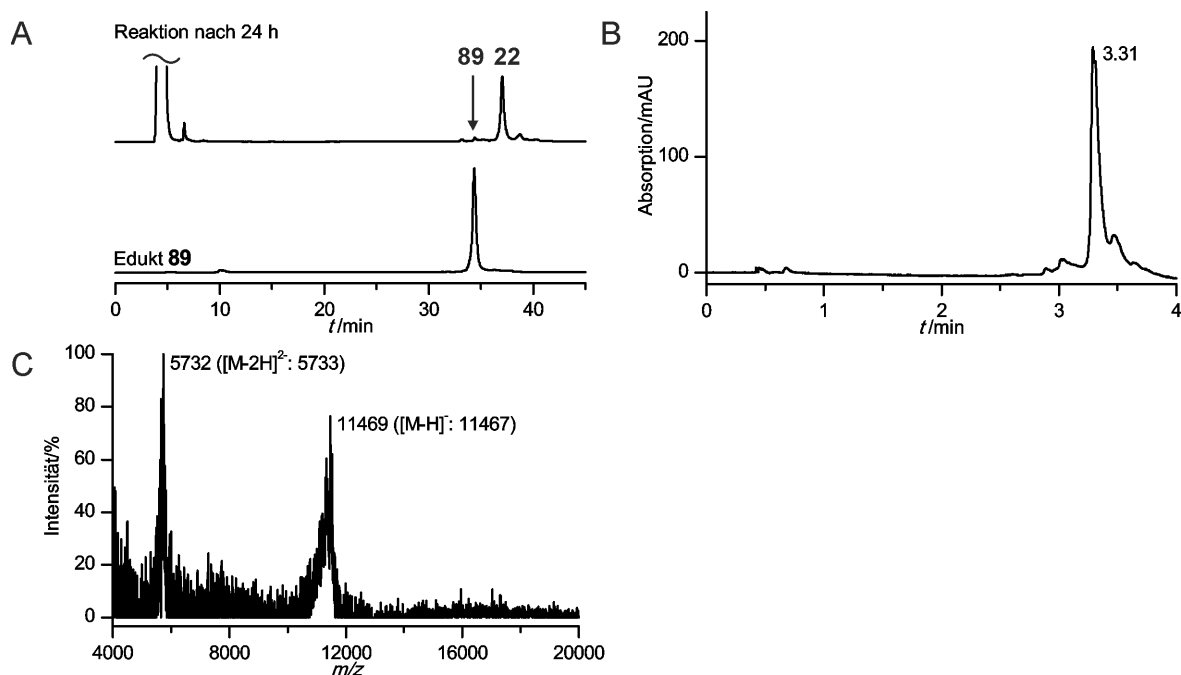


Abbildung 27: A) Reaktionsverfolgung der Synthese des Maleimido-Aptamers **22** mittels HPLC (3 % B3 für 4 min, dann 3→15 % B3 in 40 min, Säule 5, $\lambda = 260$ nm). B) UPLC-Chromatogramm (3→15 % B3 in 4 min, Säule 4, $\lambda = 260$ nm) und C) MALDI-Massenspektrum des isolierten Maleimido-Aptamers **22**.

sehr langsam bzw. nur unvollständig ab, weshalb der Überschuss auf 250 Äquivalente erhöht wurde. Nach 24 Stunden war das Amin **89** laut HPLC vollständig umgesetzt (siehe Abbildung 27A). Das Reaktionsgemisch wurde lyophilisiert und anschließend mittels Sep-Pak® C18-Säule weitgehend von den Nebenprodukten befreit (siehe Abbildung 27B und C). Mittels präparativer Umkehrphasen-HPLC konnte die Reinheit in einem Testansatz weiter erhöht werden. Es zeigte sich jedoch, dass die geringfügigen Verunreinigungen die nachfolgende Reaktion nicht störten. Daher wurde im Folgenden auf eine Aufreinigung verzichtet.

Das Hauptproblem bei der anschließenden Kupplung des Maleimido-Aptamers **22** an die Thiolhaltigen PNA-Oligomere **73** und **75** (es wurden die gleichen PNA-Sequenzen wie bei den sLe^x-PNA-Konjugaten verwendet, siehe Kapitel 4.5) war die Tatsache, dass das Maleimido-Aptamer **22** und das Aptamer-PNA-Konjugat **90** bzw. **91** nur unvollständig mittels präparativer HPLC voneinander getrennt werden konnten (siehe Abbildung 28A). Selbst bei Verwendung eines Überschusses an Thiol-PNA reagierte das Maleimido-Aptamer **22** nicht vollständig zum Aptamer-PNA-Konjugat **90** bzw. **91**. Bei Reaktionsverfolgung mittels MALDI-Massenspektrometrie wurde stets auch das Edukt **22** detektiert (siehe Abbildung 28B). Mit dem Ziel, die Polarität von nicht umgesetzten Maleimido-Aptamer **22** derart zu verringern, dass es sich vom Aptamer-PNA-Konjugat **90** bzw. **91** abtrennen lässt, wurde nach 13 Stunden Reaktionszeit Benzylmercaptan zum

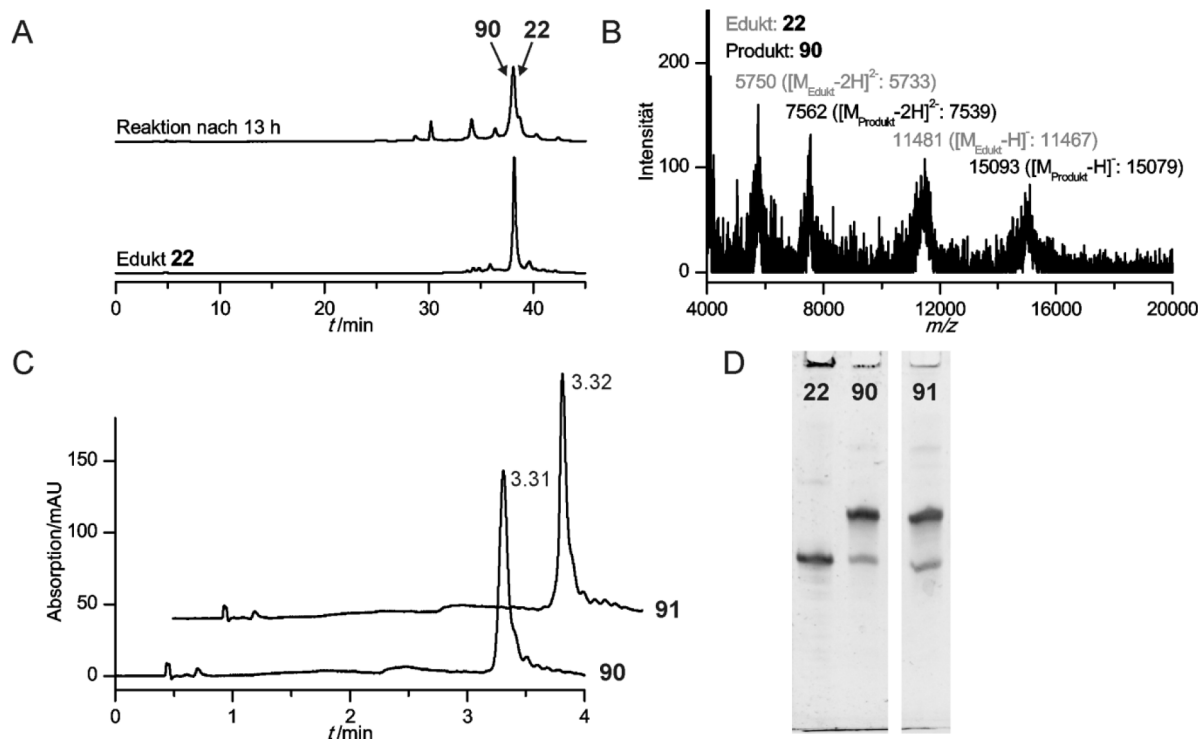


Abbildung 28: Reaktionsverfolgung der Synthese des Aptamer-PNA-Konjugats **90** mittels A) HPLC (3 % B3 für 4 min, dann 3→15 % B3 in 40 min, Säule 5, $\lambda = 260$ nm) und B) MALDI-Massenspektrometrie. C) UPLC-Chromatogramme (3→15 % B3 in 4 min, Säule 4, $\lambda = 260$ nm) und D) denaturierendes Polyacrylamid-Gel (15 % Acrylamid, 7 M Harnstoff, Auslesen der Banden nach Anfärben mit SYBR® Gold, $\lambda_{\text{Ex}} = 495$ nm, $\lambda_{\text{Em}} = 535$ nm) der isolierten Aptamer-PNA-Konjugate **90** und **91**.
















Reaktionsgemisch gegeben. Vorexperimente zeigten bereits, dass Benzylmercaptan quantitativ mit dem Maleimido-Aptamer **22** zu einem Produkt reagiert, dessen Retentionsverhalten sich signifikant vom Edukt unterscheidet. Dennoch enthielten nach präparativer HPLC der Kupplungsreaktion einige der Produktfraktionen das Aptamer. Eine genaue Identifikation der Spezies mittel Massenspektrometrie war nicht möglich. Aus dem Massenspektrum war nur ersichtlich, dass es eine ähnliche Masse wie das Maleimido-Aptamer **22** hatte. Vermutlich handelte es sich um das hydrolysierte Maleinimid des Aptamers (vergleiche mit Kapitel 4.5). Da spätestens die Zugabe von Benzylmercaptan zur vollständigen Umsetzung des Maleinimids geführt hätte, muss dieses Nebenprodukt bereits bei der Maleinimidkupplung an die Thiol-PNA entstanden sein. Nichtsdestotrotz konnten, wenngleich unter erheblichem Substanzverlust, einige Produktfraktionen isoliert werden, die laut HPLC sauberes Aptamer-PNA-Konjugat **90** bzw. **91** enthielten (siehe Abbildung 28C). An dieser Stelle sollte dennoch erwähnt werden, dass bei gelelektrophoretischer Analyse der Produkte Verunreinigungen sichtbar wurden, die eine ähnliche Masse wie das Maleimido-Aptamer **22** hatten (siehe Abbildung 28D). Die Menge dieser Verunreinigungen war jedoch gering und wurde in den nachfolgenden Experimenten vernachlässigt.






4.7 Aufbau und Eigenschaften der multivalenten Kohlenhydrat- und Aptamer-PNA•DNA-Komplexe

Das Gerüst zur multivalenten Liganden-Präsentation basiert auf dem PNA•DNA-Duplex (Details siehe Kapitel 2.5.1) und besteht aus einem DNA-Strang mit 52 Nukleotiden, an dem vier PNA-13mere hybridisieren können. Ein PNA-13mer entspricht somit einem Codon und die dazu komplementäre DNA-Sequenz einem Anticodon. Anhand der LacNAc-PNA•DNA-Komplexe **L01 – L14** (siehe Tabelle 3) soll dies hier exemplarisch beschrieben werden. Der Aufbau der Man-, sLe^x- und Aptamer-PNA•DNA-Komplexe erfolgte in Analogie dazu.

Für den Aufbau der LacNAc-PNA•DNA-Komplexe **L01 – L14** wurden drei verschiedene Codons verwendet: die PNA-13mere **76**, **77** und **79**. Zwei dieser Codons lagen, zusätzlich zum unmodifizierten PNA-Strang, mit daran befestigten LacNAc-Liganden vor (**82** und **84**). Unter der Voraussetzung, dass immer vier Codons mit dem DNA-Templat hybridisieren, ergeben sich $3^4 \cdot 4 = 324$ verschiedene Anordnungen. Berücksichtigt man zudem Komplexe, bei denen weniger als vier Codons hybridisieren, d. h. Anticodons als Einzelstrang vorliegen, steigt die Anzahl der Anordnungen weiter an. Da in dieser Arbeit primär der Abstand zwischen den präsentierten Liganden variiert werden sollte und dieser in vielen der mehr als 324 Komplexe identisch wäre, wurden nur die 14 verschiedenen Anordnungen realisiert, die in Tabelle 3 aufgelistet sind. Dabei kennzeichnet der Großbuchstabe im Kürzel den präsentierten Liganden, in diesem Fall LacNAc (L). Weitere Liganden sind Man (M), sLe^x (S) sowie das Aptamer (A). Die Nummer ist hingegen eine

Tabelle 3: Realisierte LacNAc-PNA•DNA-Komplexe **L01** – **L14**. Der Abstand zwischen den präsentierten Liganden ist ebenfalls angegeben. Bei dem tri- und tetravalenten Komplex **L12** bzw. **L13** sind jeweils die Abstände zwischen direkt benachbarten Liganden angegeben.

Komplex ^[a]	Abstand/Å	Komplex ^[a]	Abstand/Å
L00 	-		
L01 	42	L08 	127
L02 	62	L09 	146
L03 	85	L10 	146
L04 	85	L11 	-
L05 	104	L12 	62, 23
L06 	104	L13 	62, 42, 23
L07 	127	L14 	42

[a]  = 76 oder 82,  = 77 oder 84,  = 79,  = komplementärer DNA-Templatstrang,  = LacNAc.

eindeutige Kennzeichnung der verwendeten Anordnung. Wurde eine räumliche Anordnung auf mehrere Arten realisiert, ist dies durch einen Kleinbuchstaben nach der Nummer kenntlich gemacht. Demzufolge war die räumliche Anordnung der präsentierten Liganden in den Komplexen **L01** und **L01a** identisch. In den Komplexen **L01** und **M01** war die räumliche Anordnung der präsentierten Liganden ebenfalls identisch, der präsentierte Ligand war jedoch verschieden.

In Abbildung 29 ist der Aufbau der bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexe **L01** und **L05** exemplarisch gezeigt. Bei Hybridisierung von zwei Äquivalenten LacNAc-PNA-Oligomer **83** sowie zwei Äquivalenten des unmodifizierten PNA-Oligomers **77** mit dem DNA-Templat **T01** (siehe Experimenteller Teil für alle verwendeten DNA-Templatsequenzen) bildete sich der bivalente LacNAc-PNA•DNA-Komplex **L01** aus (siehe Abbildung 29A). In Kapitel 2.5.1 wurde bereits erläutert, wie die Abstände zwischen den am PNA•DNA-Duplex angebrachten Liganden berechnet werden können. Da die in dieser Arbeit betrachteten Komplexe durch mindestens 12 Nukleotide voneinander getrennt waren und weil die Linker zwischen den Liganden und dem Duplex nicht genau senkrecht von der Helix wegstanden, sondern eine gewisse Flexibilität besaßen, welche die Windung der Helix teilweise kompensierte, wurde die vereinfachte Gleichung (4) zur Abstandsberechnung verwendet. Entsprechend ergab sich für Komplex **L01**, in dem die beiden LacNAc-Liganden durch 12 Nukleotide separiert waren, ein Abstand von $(12 + 1) \cdot 3.25 \text{ Å} \approx 42 \text{ Å}$. Durch Variation der Sequenz des DNA-Templats konnte dieser Abstand verändert werden, wobei die Äquivalente der PNA-Oligomere ebenfalls angepasst werden mussten. So entstand durch Hybridisierung des DNA-Templats **T04** mit je einem Äquivalent LacNAc-PNA-Oligomer **82** und **84** sowie zwei Äquivalenten des unmodifizierten PNA-Oligomers **79** Komplex **L05** (siehe

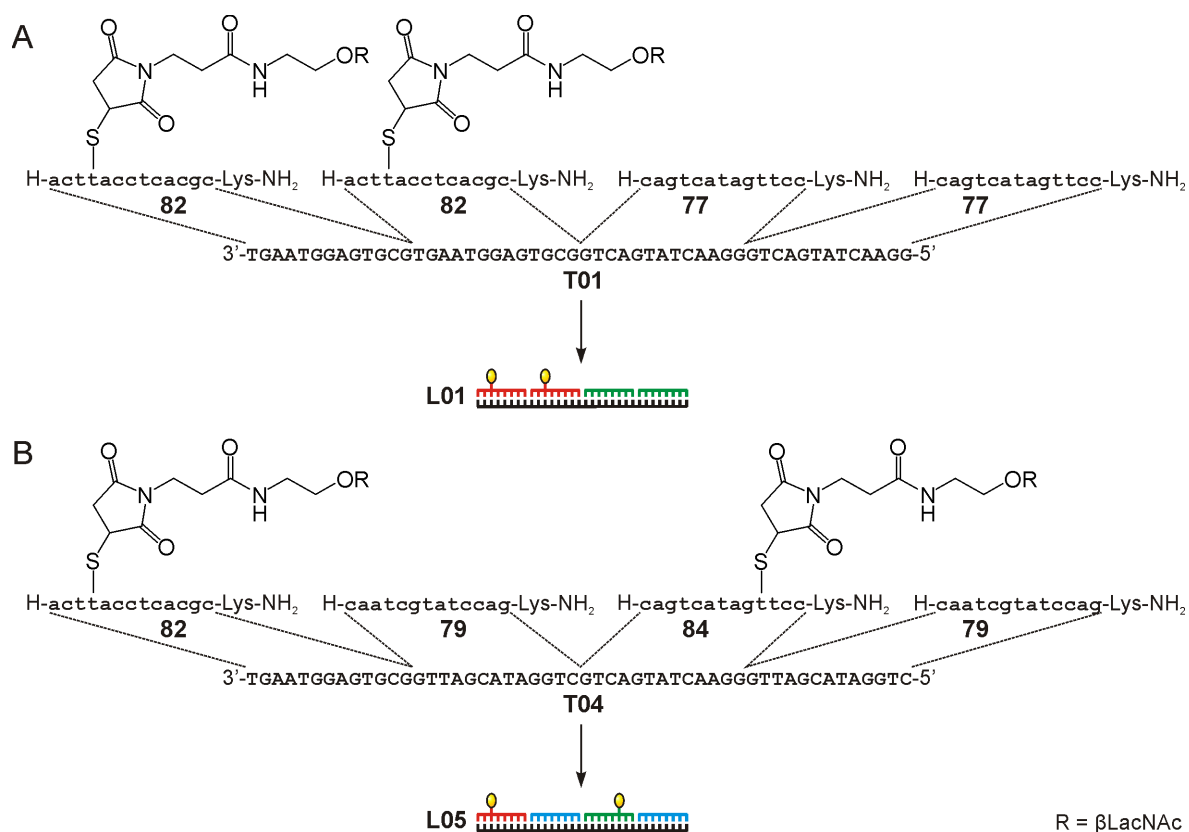


Abbildung 29: Aufbau der bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexe **L01** (A) und **L05** (B).

Abbildung 29B). In diesem betrug der Abstand zwischen den beiden LacNAc-Liganden $(31 + 1) \cdot 3.25 \text{ \AA} \approx 104 \text{ \AA}$.

Zur Hybridisierung der PNA•DNA-Komplexe wurden die einzelnen Komplexbestandteile zusammengegeben, die erhaltenen Lösungen kurz erhitzt und diese anschließend wieder langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Während dies beim Entwurf der PNA-Sequenzen nicht vorhersehbar war, stellte sich im Laufe der späteren Experimente heraus, dass das unmodifizierte PNA-Oligomer **77** sowie das LacNAc-PNA-Konjugat **84** und das Man-PNA-Konjugat **85** aufgrund ihrer Sequenz eine geringe Löslichkeit in wässrigen Lösungen aufwiesen und nach längerer Lagerung ausfielen. Infolge dessen mussten die Stammlösungen von **77**, **84** und **85** vor Verwendung kurz erhitzt und wieder langsam auf Raumtemperatur abgekühlt werden. Anschließend war die Homogenität der Stammlösungen wieder für mehrere Stunden gewährleistet. Negative Auswirkungen auf die Löslichkeit der erhaltenen PNA•DNA-Komplexe (z. B. **L01** und **L05**, Abbildung 29) hatte dieser Umstand jedoch nicht. Dennoch wurden für die nachfolgenden Experimente PNA-Oligomere verwendet, die eine höhere Löslichkeit aufwiesen. Im Detail bedeutete dies, dass das unmodifizierte PNA-Oligomer **82** durch **79** ausgetauscht wurde. Zudem wurde bei der Synthese des sLe^x-PNA-Konjugats **90** und des Aptamer-PNA-Konjugats **91** das besser lösliche PNA-Oligomer **75** verwendet (siehe Kapitel 4.5 und 4.6). Wie bereits erläutert, führte die Hybridi-












sierung mit komplementärer DNA, trotz unterschiedlicher Sequenzen, zur gleichen räumlichen Anordnung der Thiol-Seitenketten und den daran gebundenen Liganden.

Unabhängig von dem sequenzspezifischen Löslichkeitsproblem der PNA-Oligomere **77**, **84** und **85** waren sämtliche PNA•DNA-Komplexe, zumindest die vollständig gepaarten, nur bis zu einer Konzentration von ca. 40 μM löslich. Oberhalb dieser Konzentration führte auch eine Temperaturerhöhung nicht zu einer besseren Löslichkeit. Stattdessen kam es zur Aggregation der Komplexe.

Die Stabilität und Integrität eines PNA•DNA-Duplex wird häufig durch dessen Schmelztemperatur, d. h. der Temperatur, bei der 50 % des Duplexes denaturiert sind, beschrieben. Bei der UV-spektroskopischen Bestimmung der Schmelztemperatur nutzt man den Absorptionsanstieg beim Schmelzen infolge der Aufhebung elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen benachbarten Nukleobasen (hyperchromer Effekt) aus.^[109]

Tabelle 4 listet die Schmelztemperaturen der bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexe **L01a** – **L10** auf. Anhand der Schmelzkurven (siehe Abbildung 30A) ist ersichtlich, dass die LacNAc-PNA-Oligomere mit den komplementären DNA-Strängen Duplexe ausbildeten. Diese wiesen zudem nur eine Schmelztemperatur auf, d. h. bei der Denaturierung dissoziierten die bis zu vier PNA-Oligomere gleichzeitig von den DNA-Templatsträngen. Die Kupplung von zwei LacNAc-Liganden an den PNA•DNA-Duplex hatte eine Erniedrigung der Schmelztemperatur um ca. 3 $^{\circ}\text{C}$ zur Folge. Erwartungsgemäß hatten Komplexe, bei denen ein LacNAc-PNA-Konjugat **82** durch **84** ersetzt war, wegen des geringeren GC-Anteils, eine etwas niedrigere Schmelztemperatur. Die Einführung von Einzelstrangabschnitten führte, aufgrund der partiellen Aufhebung von Stapelwechselwirkungen an den Enden der PNA-Oligomere, ebenfalls zu einer Schmelztemperaturerniedrigung.

Tabelle 4: Schmelztemperaturen der LacNAc-PNA•DNA-Komplexe **L01a** – **L10**. (Bedingungen: 0.5 μM PNA•DNA-Komplex, 10 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.0)

Komplex	$T_M / ^{\circ}\text{C}$	Komplex	$T_M / ^{\circ}\text{C}$
L00a 	74		
L01a 	70		
L02 	67		
L03a 	71	L04a 	67
L05 	68	L06 	66
L07a 	73	L08a 	66
L09 	68	L10 	64

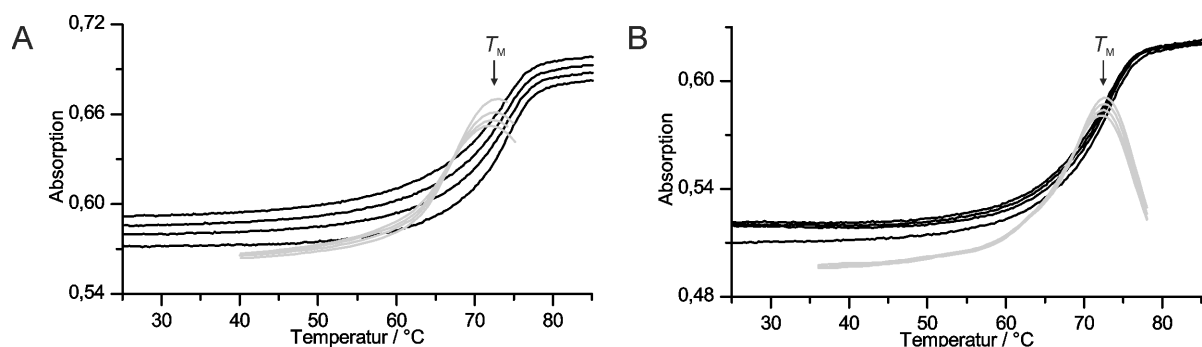


Abbildung 30: Schmelzkurven (—) und die ersten Ableitungen (---) zur Bestimmung der Schmelztemperatur T_M des bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexes **L07a** (A) und des bivalenten sLe^X-PNA•DNA-Komplexes **S07** (B). (Bedingungen: 0,5 μ M PNA•DNA-Komplex, 10 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7,0)

Obwohl die Duplexstabilität mit sinkender Konzentration an PNA•DNA-Duplex abnimmt,^[110] war in diesem Fall die Duplexintegrität bei Raumtemperatur auch bei picomolaren Konzentrationen gewährleistet, da sämtliche Komplexe eine Schmelztemperatur oberhalb von 60 °C hatten. Auch wenn die Sequenzen in den Komplexen **L00a**, **L01a**, **L03a**, **L04a**, **L07a** und **L08a** geringfügig von denen in den Komplexen **L00**, **L01**, **L03**, **L04**, **L07** und **L08** abwichen, kann davon ausgegangen werden, dass in beiden Fällen stabile PNA•DNA-Duplexe vorlagen.

Die Schmelztemperaturen der LacNAc-PNA•DNA-Komplexe (Tabelle 4) verdeutlichen, dass die Duplexstabilität durch die Kupplung von zwei LacNAc-Liganden an das PNA-Rückgrat nur minimal beeinträchtigt wird. Da sich ein ähnliches Bild bei der Kupplung von zwei sLe^X-Liganden an den PNA•DNA-Duplex ergab (siehe Abbildung 30B und Tabelle 5), kann angenommen werden, dass die Man-PNA-Konjugate ebenfalls stabile PNA•DNA-Duplexe ausbildeten.

Die Anbringung von zwei Aptamer-Liganden führte zu einer stärkeren Destabilisierung des PNA•DNA-Duplex als dies im Fall von zwei Kohlenhydrat-Liganden der Fall war (siehe Tabelle 6).

Tabelle 5: Schmelztemperaturen der sLe^X-PNA•DNA-Komplexe **S01** – **S10**. (Bedingungen: 0,5 μ M PNA•DNA-Komplex, 10 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7,0)

Komplex	T_M / °C	Komplex	T_M / °C
S00d	74	S04	64
S01	71	S06	64
S02	70	S08	63
S03	73	S10	64
S05	68		
S07	73		
S09	70		

Tabelle 6: Schmelztemperaturen der Aptamer-PNA•DNA-Komplexe **A01** – **A10** sowie des Aptamers **89** allein. $T_{M,1}$ ist die Schmelztemperatur des Aptamers, $T_{M,2}$ die Schmelztemperatur des PNA•DNA-Duplexes. (Bedingungen: 0.5 μ M PNA•DNA-Komplex, 10 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.0)

Komplex		$T_{M,1}/^\circ\text{C}$	$T_{M,2}/^\circ\text{C}$	Komplex		$T_{M,1}/^\circ\text{C}$	$T_{M,2}/^\circ\text{C}$
A00d		-	74	89		46	-
A01		48[a]	68				
A02		47[a]	71				
A03		44	69	A04		43	69[a]
A05		46[a]	66	A06		41	59[a]
A07		43	[a]	A08		43	61[a]
A09		46	70	A10		42	75[a]

[a] Bestimmung der Schmelztemperatur nicht möglich oder ungenau.

Da das Aptamer ebenfalls einen stabilen DNA•DNA-Duplex ausbildete und dessen Denaturierung ($T_{M,1} = 46^\circ\text{C}$) teilweise mit der des PNA•DNA-Duplexes ($T_{M,2}$) überlappte, war eine genaue Bestimmung beider Schmelztemperaturen teilweise mit großer Ungenauigkeit verbunden (vergleiche Abbildung 31A mit Abbildung 31B). **A07** war zudem der einzige Komplex, bei dem nur die Schmelztemperatur der Aptamer-Liganden ($T_{M,1}$), nicht jedoch die des PNA•DNA-Duplexes ($T_{M,2}$) ermittelt werden konnte (siehe Abbildung 31B). Verunreinigungen oder gar eine fehlerhafte Sequenz des DNA-Templats **T05a** können als Ursache dafür weitgehend ausgeschlossen werden, da der sLe^x-PNA•DNA-Komplex **S07** einen stabilen Duplex ausbildete (siehe Abbildung 30B) und dessen PNA•DNA-Gerüst die gleiche Sequenz wie das von **A07** hatte. Eine Destabilisierung von **A07** durch sequenzspezifische Wechselwirkungen der Aptamer-Liganden mit dem PNA•DNA-Gerüst könnte jedoch ein möglicher Grund gewesen sein. Für die Aptamer-PNA•DNA-Komplexe **A01** – **A06** und **A08** – **A10** wurden hingegen Schmelztemperaturen von mindestens 59°C ermittelt, d. h. es konnte angenommen werden, dass diese stabil waren und in dem untersuchten Konzentrationsbereich bei Raumtemperatur hybridisiert vorlagen.

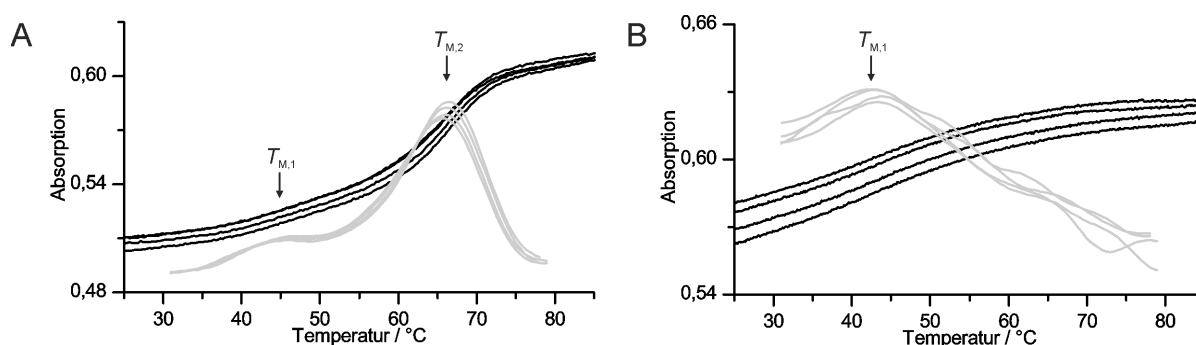


Abbildung 31: Schmelzkurven (—) und die ersten Ableitungen (—) zur Bestimmung der Schmelztemperaturen $T_{M,1}$ und $T_{M,2}$ der bivalenten Aptamer-PNA•DNA-Komplexe **A05** (A) und **A07** (B). $T_{M,1}$ ist die Schmelztemperatur des Aptamers, $T_{M,2}$ die Schmelztemperatur des PNA•DNA-Duplexes. (Bedingungen: 0.5 μ M PNA•DNA-Komplex, 10 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.0)

4.8 Entwicklung eines molekularen Lineals auf PNA•DNA-Basis

4.8.1 Übersicht

Für die Entwicklung des molekularen Lineals wurde zunächst die Genauigkeit und Vorhersagbarkeit der Ligandenpräsentation in den multivalenten Kohlenhydrat-PNA•DNA-Komplexen aus Kapitel 4.7 untersucht. Aus diesem Grund wurde systematisch der Abstand zwischen den Liganden sowie die Valenz und Flexibilität der Kohlenhydrat-PNA•DNA-Komplexe variiert. Sofern es zu multivalenten Wechselwirkungen kommt, sollten alle drei Parameter Einfluss auf das Bindungsverhalten der Komplexe haben. Als multivalente Bindungspartner wurden *Erythrina cristagalli* Lektin (ECL), *Ricinus communis* Agglutinin (RCA₁₂₀) und Concanavalin A (ConA) ausgewählt.

ECL kommt in den Samen des Korallenbaumes *Erythrina cristagalli* vor. Jede Untereinheit dieses 54 kDa schweren, heterodimeren Proteins besitzt eine Bindungsstelle für Galactose-haltige Kohlenhydrate, darunter auch *N*-Acetylactosamin. Der direkte Abstand zwischen den Bindungstaschen beträgt 65 Å. Da sich die Bindungstaschen jedoch auf entgegengesetzten Seiten des Proteins befinden, muss sich ein potentiell bivalentes Substrat um das Protein biegen (siehe Abbildung 32A). Der Abstand entlang des Helixgerüsts vergrößert sich dadurch auf ca. 100 Å.^[111]

Das aus Rizinussamen gewonnene *Ricinus communis* Agglutinin (RCA₁₂₀) wurde bereits in den Arbeiten von Kobayashi *et al.* untersucht (siehe Kapitel 2.5.2).^[72-73] Es hat ein Molekulargewicht von 120 kDa und besteht aus vier Untereinheiten, wobei diese die Zusammensetzung BAAB haben. Jede B-Untereinheit besitzt eine Bindungstasche spezifisch für Galactose. In der von Gabdoulkhakov *et al.*^[75] veröffentlichten Kristallstruktur wurde RCA₁₂₀ zwar mit elf Molekülen Galactose kokristallisiert, doch nur eine der beiden Bindungstaschen war besetzt (siehe Abbildung 32C). Weil das Lektin symmetrisch ist und die an der Bindung beteiligten Aminosäuren bekannt sind, kann der direkte Abstand zwischen den Bindungstaschen dennoch bestimmt werden und beträgt demnach 120 Å.^[74] Ein bivalentes Substrat, dass simultan an beide Bindungstaschen bindet, muss jedoch eine leicht gebogene Konformation einnehmen, weshalb der Abstand entlang des Helixgerüsts mit ca. 130 Å etwas größer ist.

Concanavalin A (ConA) ist ein aus den Samen der Jackbohne *Canavalia ensiformis* isoliertes Lektin, das spezifisch an Mannose bindet. Je nach pH-Wert liegt es bevorzugt als Homodimer (pH < 5.6) oder Homotetramer (pH > 5.6) vor. Aufgrund der räumlichen Lage ist der Abstand zwischen den Bindungstaschen mit rund 80 Å etwas größer als der direkte Abstand von 72 Å (siehe Abbildung 32B).^[112]

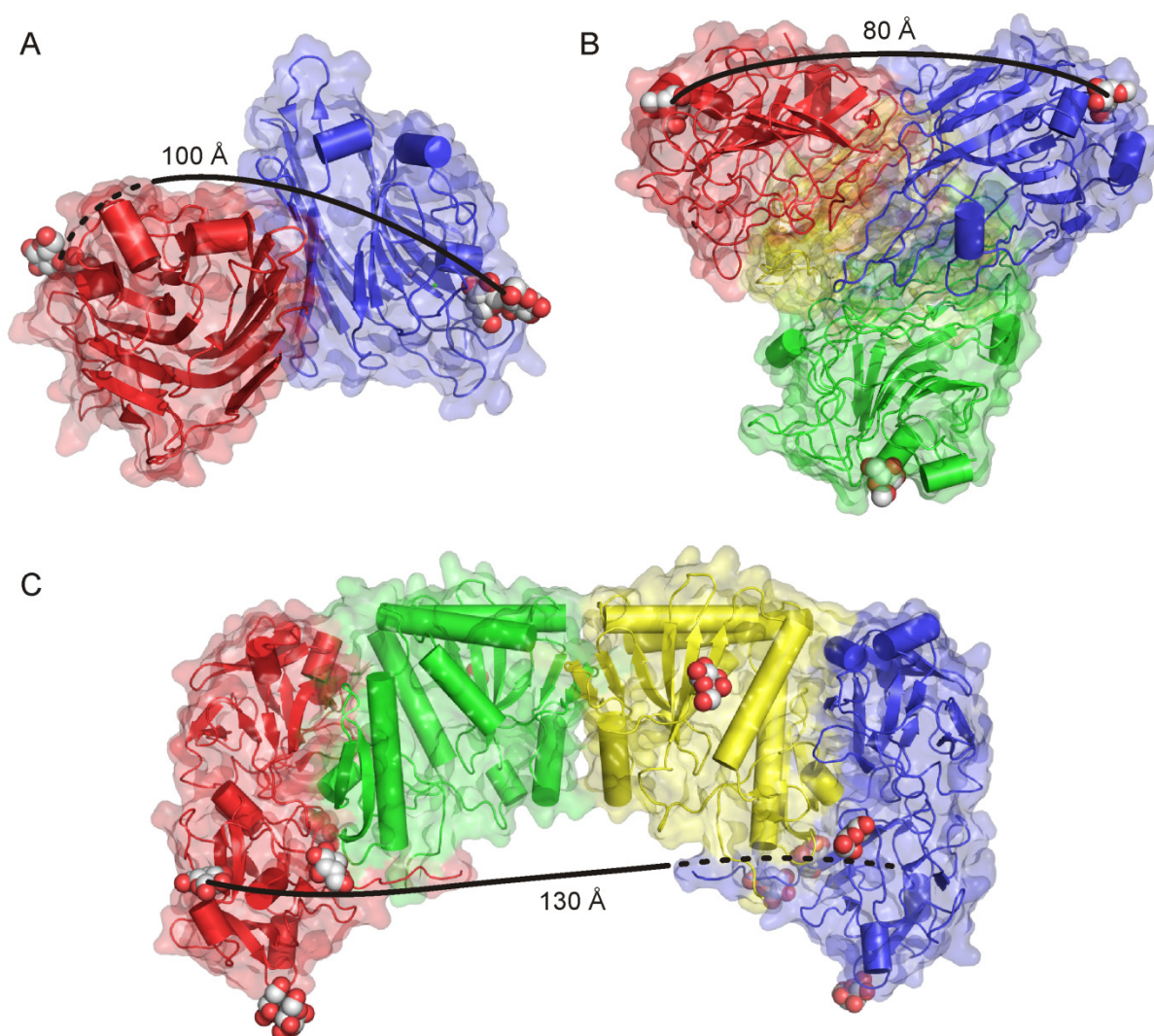


Abbildung 32: Kristallstrukturen und Abstände zwischen den Bindungstaschen der untersuchten Lektine. A) *Erythrina cristagalli* Lektin mit gebundener D-Lactose (1uzy.pdb),^[111] B) Concanavalin A mit gebundenem Methyl- α -D-mannosid (5cna.pdb),^[112] C) *Ricinus communis* Agglutinin kokristallisiert mit elf Molekülen D-Galactose (1rzo.pdb).^[75]

Das Bindungsverhalten der multivalenten Kohlenhydrat-PNA•DNA-Komplexe gegenüber den drei Lektinen wurde in einem SPR-basierten Assay untersucht. N-Acetylglucosamin diente als Ligand für ECL und RCA₁₂₀, Mannose als Ligand für ConA. Der Vergleich von drei verschiedenen Lektinen sollte Rückschlüsse über die Genauigkeit, Anwendbarkeit, Allgemeingültigkeit und Aussagekraft des entwickelten Systems ermöglichen.

Weil das Bindungsverhalten mitunter stark von den experimentellen Rahmenbedingungen des verwendeten Bindungsassay abhängt,^[113-114] wurden die Wechselwirkungen der LacNAc-PNA•DNA-Komplexe mit ECL, zusätzlich zu dem bereits erwähnten SPR-basierten Assay, auch in einem Enzym-gekoppelten Lektin-Assay (ELLA) und einem Fluoreszenzanisotropie-Assay untersucht. Bei dem SPR-basierten Assay handelte es sich um einen heterogenen Assay, der die direkte Bestimmung der Bindungsaffinitäten erlaubte. Einer der Bindungspartner, nämlich das

Lektin, war dabei immobilisiert. Der ELLA war ebenfalls heterogen, allerdings wurde weder ECL noch der LacNAc-PNA•DNA-Komplex, sondern ein dritter, konkurrierender Bindungspartner immobilisiert. In dem Fluoreszenzanisotropie-Assay wurde die Wechselwirkung ebenfalls in Gegenwart eines konkurrierenden Bindungspartners untersucht. Im Unterschied zu dem ELLA war allerdings keiner der beteiligten Bindungspartner immobilisiert.

Des Weiteren wurden in Kooperation mit Alexander Bujotzek und Dr. Marcus Weber (Zuse Institut Berlin, Deutschland) moleküldynamische Simulationen durchgeführt, welche das Ziel hatten, den Einfluss der Flexibilität der LacNAc-PNA•DNA-Komplexe auf die Bindung mit ECL zu untersuchen.

4.8.2 Enzym-gekoppelter Lektin-Assay (ELLA)

4.8.2.1 Prinzip des Enzym-gekoppelten Lektin-Assays (ELLA)

Der Enzym-gekoppelte Lektin-Assay (ELLA)^[115-116] ähnelt dem Enzym-gekoppelten Immunosorbent-Assay (ELISA), mit dem Unterschied, dass die Anbindung des Analyten an das zu analysierende Molekül nicht über die Bindung eines Antigens an einen Antikörper, sondern über die Bindung von Streptavidin an Biotin stattfindet. Bei dem Analyten handelt es sich in der Regel um ein Enzym, das eine Farbreaktion katalysiert über welche dann die quantitative Auslesung erfolgt. Durch die enzymatische Farbreaktion wird das Signal verstärkt und die Nachweisgrenze herabgesetzt. Nachteil dieses heterogenen Assays ist, dass die notwendige Biotinylierung von einem der Bindungspartner dessen Bindungseigenschaften verändern kann.

Das hier angegebene Protokoll bezieht sich auf die Messungen mit ECL, da dieses Lektin als einziges mittels ELLA untersucht worden ist. Im Detail wurde dabei die Bindung von ECL an immobilisiertes Asialofetuin (Glykoprotein, das neun Lactose-Liganden via drei verzweigter *N*-Glykane präsentiert^[117]) durch Zugabe von LacNAc-PNA•DNA-Komplex inhibiert. Die Bindungsaffinitäten der einzelnen Komplexe wurden über ihre IC₅₀-Werte verglichen, d. h. die Konzentrationen, bei denen die Bindung von ECL an Asialofetuin zu 50 % inhibiert wurde.

Der Assay wurde in 384er-Mikrotiterplatten mit hochbindender Oberfläche durchgeführt. In Abbildung 33 sind die einzelnen Schritte schematisch dargestellt. Zu Beginn wurde Asialofetuin auf der Oberfläche immobilisiert [1]. Statt dem reinen Glykoprotein wurde jedoch ein Gemisch aus Asialofetuin und BSA immobilisiert. Dadurch wurde die effektive Beladung der Oberfläche mit Asialofetuin reduziert und folglich die Wahrscheinlichkeit für eine intermolekulare Wechselwirkung eines ECL-Moleküls mit zwei immobilisierten Asialofetuin-Molekülen verringert. Weil jedoch mit sinkendem Anteil an immobilisierten Asialofetuin auch weniger ECL-Moleküle daran

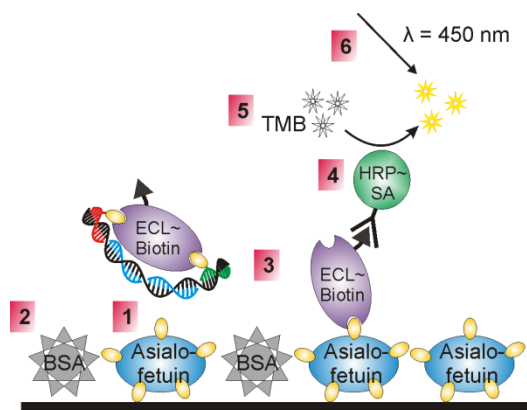


Abbildung 33: Prinzip des Enzym-gekoppelten Lektin-Assays (ELLA). [1] Immobilisierung von Asialofetuin auf der Oberfläche, [2] Blockierung frei gebliebener Oberfläche mit BSA, [3] Inkubation mit Probe, d. h. Gemisch aus biotinylierten ECL (ECL~Biotin) und LacNAc-PNA•DNA-Komplex, [4] Inkubation mit Streptavidin konjugierter Meerrettichperoxidase (HRP~SA), [5] Inkubation mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid, [6] Zugabe von Schwefelsäure und Detektion der Absorption bei $\lambda = 450 \text{ nm}$.

banden, d. h. die Signalstärke abnahm, konnte die Menge an immobilisierten Asialofetuin nicht beliebig reduziert werden. In Vorexperimenten wurde der Einfluss des Anteils an immobilisierten BSA auf die Signalstärke untersucht. Wurde die Immobilisierung mit einer Zusammensetzung von $5:50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Asialofetuin:BSA durchgeführt, war eine ausreichende Signalstärke gewährleistet. Bei weiterer Vergrößerung des BSA-Anteils war das Signal hingegen nicht mehr aussagekräftig. Um eine vollständige Beladung der Oberfläche zu realisieren, d. h. reproduzierbare Bedingungen zu gewährleisten, wurde die Immobilisierung über Nacht bei 4°C durchgeführt. Eventuell frei gebliebene Oberflächen wurden anschließend mit BSA blockiert [2]. Im nächsten Schritt wurde ein Gemisch aus biotinylierten ECL (ECL~Biotin) und LacNAc-PNA•DNA-Komplex zugegeben [3]. Die Konzentration von ECL~Biotin wurde konstant gehalten, die des LacNAc-PNA•DNA-Komplexes schrittweise erhöht. Der LacNAc-PNA•DNA-Komplex konkurrierte dabei mit Asialofetuin um die beiden Bindungsstellen von ECL. Je nach Konzentration an LacNAc-PNA•DNA-Komplex band mehr oder weniger ECL~Biotin an das immobilisierte Asialofetuin. Da die Löslichkeit des LacNAc-PNA•DNA-Komplexes der limitierende Faktor war, konnte die Konzentration jedoch nur bis auf $30 \mu\text{M}$ erhöht werden. Obwohl diese Konzentration nicht für eine vollständige Inhibierung ausreichte, wurden die Daten zur Berechnung des IC_{50} herangezogen, da zumindest mehr als 50 % Inhibierung auftrat und dieser Bereich für die Bestimmung des IC_{50} am bedeutungsvollsten ist. Nach zwei Stunden Inkubation wurde die Oberfläche gewaschen, wobei nur an Asialofetuin gebundenes ECL~Biotin zurückblieb. Um eine quantitative Aussage über die Menge an gebundenen ECL~Biotin zu erhalten, wurde anschließend mit Streptavidin konjugierte Meerrettichperoxidase (HRP) zugegeben [4]. Diese band an Biotin und katalysierte, nach Zugabe von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid, die Oxidation von TMB [5]. Durch Zugabe von Schwefelsäure wurde die Reaktion gestoppt und die gelbe Lösung färbte sich blau. Zum Schluss wurde die Absorption bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ gemessen [6].

und die Konzentration des gebildeten Reaktionsprodukts, welche direkt proportional zur Menge an gebundenen ECL~Biotin an immobilisierten Asialofetuin war, über das Lambert-Beer'sche Gesetz^[118] bestimmt.

4.8.2.2 Untersuchungen zur Bindungsaffinität von ECL mittels ELLA

Zunächst wurde der IC_{50} für Lactose und Asialofetuin bestimmt. Erwartungsgemäß inhibierte Lactose nur bei sehr hohen Konzentrationen ($IC_{50} = 483 \mu M$) die Bindung von ECL an immobilisiertes Asialofetuin, während Asialofetuin selber bereits bei einer Konzentration von $0.60 \mu M$ zu 50 %iger Inhibierung führte (siehe Abbildung 34A). Obwohl *N*-Acetyllactosamin mit höherer Affinität als Lactose an ECL bindet und z. B. in Hämagglutinationsassays ein um den Faktor 4 – 5 besserer Inhibitor als Lactose ist,^[119-120] war der IC_{50} des monovalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexes **L11a** mit $30 \mu M$ sehr klein. Ein Grund für die hohe inhibitorische Wirkung von **L11a** könnte sterische Stabilisierung (siehe Kapitel 2.1.4) gewesen sein, d. h. das voluminöse PNA•DNA-Gerüst des monovalenten Komplexes **L11a** schirmte ECL vor Wechselwirkungen mit immobilisiertem Asialofetuin ab. Wechselwirkungen des PNA•DNA-Gerüsts mit ECL konnten hingegen als Ursache ausgeschlossen werden, da der unmodifizierte PNA•DNA-Komplex **L00b** mit der gleichen Sequenz zu keiner Inhibierung führte.

Durch Einführen eines weiteren LacNAc-Liganden (Komplex **L05**) sank der IC_{50} auf $23 \mu M$. Während bei den SPR-Messungen an ECL durchschnittlich eine 33-fache Erhöhung der Bindungsaffinität pro LacNAc-Ligand beim Übergang von mono- zu bivalenter Präsentation beobachtet wurde (siehe Tabelle 7, Kapitel 4.8.4.2), betrug der Faktor hier im besten Fall 1.4 (Komplex **L01a**, $IC_{50} = 11 \mu M$). Dies deutete darauf hin, dass eine bivalente Bindung an ECL entweder inhibiert war oder andere Bindungsmodi bevorzugt waren. Zum Beispiel könnte eine Bindungstasche von ECL an immobilisiertes Asialofetuin gebunden haben, während an die andere ein Ligand des LacNAc-PNA•DNA-Komplexes gebunden war. Des Weiteren könnte die Menge an immobilisierten Asialofetuin so hoch gewesen sein, dass eine Wechselwirkung zwischen einem ECL-Molekül und zwei Asialofetuin-Molekülen wahrscheinlicher war als zwischen einem ECL-Molekül und einem bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplex. Während sich die einzelnen Moleküle an LacNAc-PNA•DNA-Komplex in der gesamten Lösung gleichmäßig verteilten, lag Asialofetuin konzentriert an der Oberfläche vor. Dieser Konzentrationsunterschied führte unter Umständen dazu, dass die Wahrscheinlichkeit für die Bindung von ECL an Asialofetuin größer war als für die Bindung an LacNAc-PNA•DNA-Komplex. Durch Verringerung der Menge an immobilisierten Asialofetuin kann dieser Konzentrationsunterschied verkleinert werden. Obwohl diesem Umstand beim Entwurf des Assays (siehe Kapitel 4.8.2.1) bereits Rechnung getragen wurde und so wenig Asialofetuin wie möglich immobilisiert wurde, ist denkbar, dass der Beladungsgrad noch immer zu hoch war. Folglich war die Bindung von ECL an Asialofetuin gegenüber den

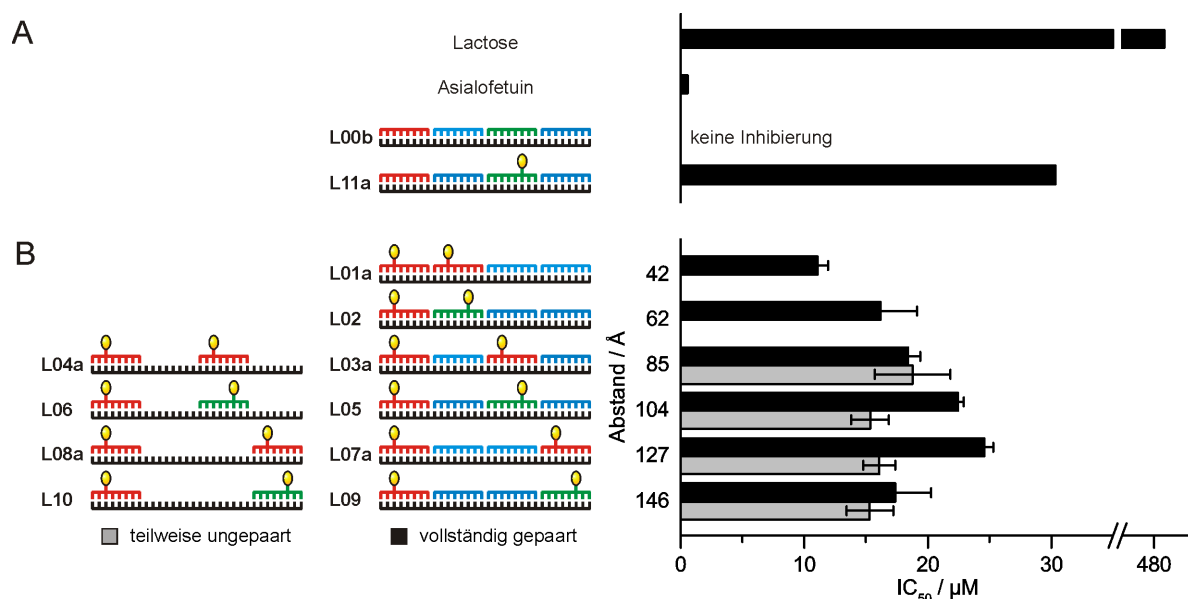


Abbildung 34: Konzentrationen für die 50 %ige Inhibition (IC_{50}) der Wechselwirkung zwischen Asialofetuin und biotinyliertem ECL für A) Lactose, Asialofetuin, den unmodifizierten Komplex **L00b** sowie den monovalenten Komplex **L11a** und B) die bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexe **L01a** – **L10**. Für die Komplexe **L01a** – **L10** sind der Mittelwert aus 2 oder 3 unabhängigen Experimenten sowie die Standardabweichung angegeben. (Bedingungen: 1 h Inkubation bei 37 °C, 5 nM ECL~Biotin, Puffer: 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.1 mM $MnCl_2$, 0.1 mM $CaCl_2$, 0.1 % BSA, pH 7.4)

LacNAc-PNA•DNA-Komplexen bevorzugt. Die LacNAc-PNA•DNA-Komplexe waren dadurch hauptsächlich auf eine monovalente Bindung an die zweite, noch freie Bindungstasche von ECL beschränkt. Aus diesem Grund wiesen die bivalenten Komplexe **L01a** – **L10** untereinander nur geringe Unterschiede in ihrer Bindungsaffinität auf (siehe Abbildung 34B).

Unspezifische Wechselwirkungen zwischen BSA und ECL könnten ebenfalls dazu geführt haben, dass ECL, unabhängig vom zugesetzten Inhibitor (z. B. LacNAc-PNA•DNA-Komplex), an der Oberfläche assoziierte. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden die Messungen auch mit Tween-20 statt BSA als Additiv durchgeführt. Zudem wurde beim Immobilisieren des Lektins auf der Näpfchenoberfläche dieses nicht mehr mit BSA gemixt. Die erhaltenen IC_{50} -Werte wiesen jedoch keine gravierenden Unterschiede zu den Messungen mit BSA auf (nicht gezeigt), so dass unspezifische Wechselwirkungen ausgeschlossen werden konnten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der ELLA ungeeignet war, um die Wechselwirkungen zwischen ECL und den bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexen zu untersuchen. Um die aufgeführten Probleme zu umgehen, wurden die Wechselwirkungen in einem homogenen, ebenfalls kompetitiven, Fluoreszenzanisotropie-Assay (siehe Kapitel 4.8.3.1) untersucht. Außerdem wurde die Bindung auch direkt in einem SPR-basierten Assay (siehe Kapitel 4.8.4.1) untersucht.

4.8.3 Fluoreszenzanisotropie-Assay

4.8.3.1 Prinzip des Fluoreszenzanisotropie-Assays

Fluoreszenzanisotropie (oder Fluoreszenzpolarisation) beschreibt das Phänomen, dass Fluorophore, die mit linear polarisiertem Licht angeregt werden, ebenfalls linear polarisiertes Licht emittieren.^[121] Sind die Fluorophore dabei frei beweglich, wie dies z. B. in Lösung der Fall ist, hebt deren Rotationsdiffusion die Polarisation mit der Zeit wieder auf. Neben der Viskosität des Lösungsmittels hängt die Rotationsdiffusion von der Form und Größe des rotierenden Moleküls ab. Kleine Moleküle rotieren schneller als große und führen in kürzerer Zeit zur Depolarisation der Emission (siehe Abbildung 35). Über die Polarisation können demnach Informationen über die Masse des fluoreszierenden Moleküls erhalten werden. Unter der Voraussetzung, dass einer der Bindungspartner fluoresziert und der Bindungsvorgang mit einem großen Massenunterschied verbunden ist, kann die Bindung zweier Teilchen mittels Fluoreszenzanisotropie untersucht werden. Das Anbringen eines Fluorophors an einen der Bindungspartner stellt jedoch einen entscheidenden Nachteil von Fluoreszenzanisotropie-Assays dar. Vorteile sind die geringe Nachweisgrenze im subnanomolaren Bereich sowie die Tatsache, dass es sich um einen homogenen Assay handelt, der ohne Waschschrte auskommt und in Echtzeit verfolgt werden kann.

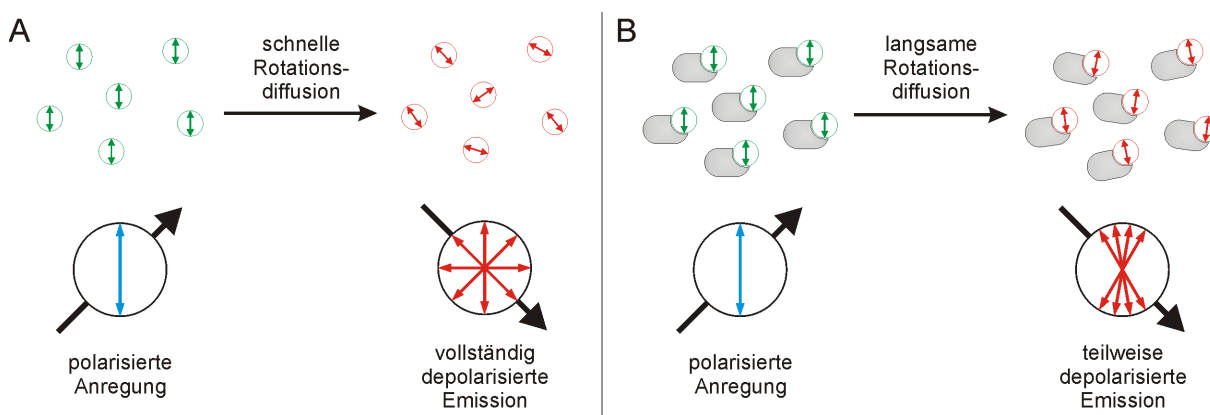


Abbildung 35: Fluorophore (grün) werden mit polarisiertem Licht (blau) angeregt. Während der Fluoreszenzlebensdauer rotieren kleine Moleküle (A) schneller als große Moleküle (B). Infolge dessen ist das Emissionslicht (rot) bei kleinen Molekülen stärker depolarisiert.

Wie bereits erwähnt, können mittels Fluoreszenzanisotropie Wechselwirkungen zwischen zwei Bindungspartnern untersucht werden, z. B. die Bindung eines Kohlenhydrat-Liganden an ein Lektin (Rezeptor). Lässt man die Konzentration an Ligand konstant und misst die Fluoreszenzanisotropie bei verschiedenen Konzentrationen an Rezeptor, kann aus den erhaltenen Daten die Dissoziationskonstante K_D berechnet werden.^[122] Alternativ dazu können auch IC_{50} -Werte bestimmt werden. Dabei wird ein fluoreszierender Referenzligand, der an einen Rezeptor gebunden ist, durch Zugabe eines Konkurrenzliganden aus der Bindungstasche verdrängt. Die Konzentration, bei der 50 % des Referenzliganden verdrängt sind, ist als IC_{50} definiert.

4.8.3.2 Untersuchungen zur Bindungsaffinität von ECL mittels Fluoreszenzanisotropie

Zunächst wurden optimale Bedingungen für die Durchführung des Assays ermittelt, indem die Dissoziationskonstante der Bindung von Lactose an ECL bestimmt wurde. Dazu wurde Fluorescein-markierte Lactose **67** mit steigenden Konzentrationen an ECL versetzt und die Zunahme der Fluoreszenzanisotropie verfolgt. Zunächst wurden nur 5 nM Lac~FAM **67** vorgelegt. Da es bei dieser niedrigen Konzentration jedoch zu starken Schwankungen der Messwerte kam (nicht gezeigt), wurde die Konzentration auf 50 nM Lac~FAM **67** erhöht. Weiterhin konnte die Konzentration an ECL aus Kostengründen nicht beliebig erhöht werden, weshalb die Bindungstaschen von ECL auch nicht gesättigt werden konnten (siehe Abbildung 36). Dennoch lag die bestimmte Dissoziationskonstante von 23 μM in guter Übereinstimmung mit der von de Boeck *et al.* ermittelten ($K_D = 25 \mu\text{M}$).^[123]

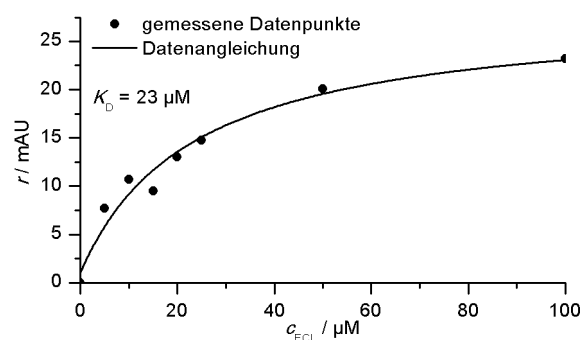


Abbildung 36: Bestimmung der Dissoziationskonstante für die Bindung von Lac~FAM **67** an ECL mittels Fluoreszenzanisotropie. (Bedingungen: 0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , pH 7.2, 50 nM Lac~FAM **67**, 5 \rightarrow 100 μM ECL, 30 $^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{Ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 520 \text{ nm}$)

Bei der Bestimmung der Dissoziationskonstante von Lac~FAM **67** zeigte sich bereits, dass die Menge an ECL ein limitierender Faktor war. Eine Bestimmung der Dissoziationskonstanten für die Bindung der LacNAc-PNA•DNA-Komplexe an ECL war demnach nicht möglich. Stattdessen wurden die IC_{50} -Werte für die Inhibierung der Bindung von Lac~FAM **67** an ECL bestimmt. Es wurden erneut 50 nM Lac~FAM **67** verwendet. ECL wurde hingegen, aufgrund der geringen Affinität zu Lactose, in einer Konzentration von 20 μM vorgelegt. Obwohl ein großer Überschuss an ECL auch den Einsatz von mehr Inhibitor, d. h. LacNAc-PNA•DNA-Komplex, bedingte, konnte die Menge an ECL nicht verringert werden, da sonst der dynamische Bereich der Anisotropie zwischen gebundener und freier Fluorescein-markierter Lactose **67** zu klein gewesen wäre. Weil sich außerdem die Oberfläche der Lösungen in den einzelnen Nöpfchen je nach Zusammensetzung unterschied, wurde der eingesetzte Puffer mit 0.05 % Tween-20 versetzt.

Neben den LacNAc-PNA•DNA-Komplexen wurden auch Asialofetuin und Lactose als Inhibitoren untersucht. Während die Werte bei der Verdrängung mit Lactose stark schwankten und kein Trend erkennbar war (siehe Abbildung 37B), scheiterte die IC_{50} -Bestimmung von Asialofetin an

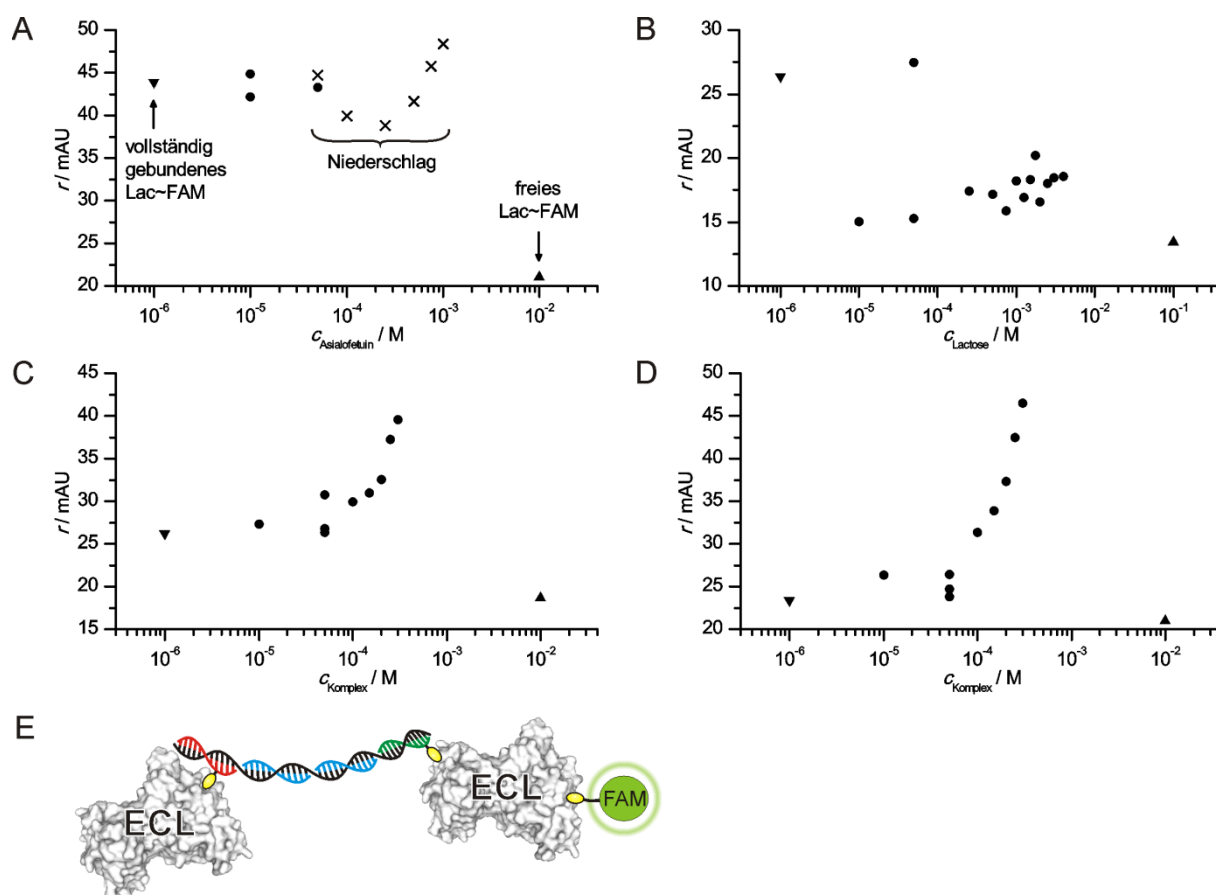


Abbildung 37: Inhibition der Bindung von Lac~FAM **67** an ECL durch Asialofetuin (A), Lactose (B), und die bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexe **L02** (C) und **L02a** (D). Die Fluoreszenzanisotropie für gebundenes Lac~FAM wurde von einer Probe mit 50 nM Lac~FAM **67** und 20 μM ECL ohne Inhibitor, die für freies Lac~FAM von einer Probe mit 50 nM Lac~FAM **67** ohne ECL und ohne Inhibitor bestimmt. (Bedingungen: 0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 0.05 % Tween-20, pH 7.2, 50 nM Lac~FAM **67**, 20 μM ECL, $\lambda_{\text{Ex}} = 485$ nm, $\lambda_{\text{Em}} = 520$ nm); E) Intermolekulare Bindung eines bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexes an zwei ECL-Moleküle, wobei eines davon zusätzlich auch Lac~FAM **67** gebunden hat.

der Tatsache, dass dieses bei Zugabe in Konzentrationen größer 10 μM unlösliche Komplexe mit ECL ausbildete (siehe Abbildung 37A). Diese intermolekulare Aggregation ist typisch für die Wechselwirkung zwischen Asialofetuin und ECL und bereits ausgiebig untersucht worden.^[124] Anschließend wurden die bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexe **L02** und **L02a** untersucht (siehe Abbildung 37C und D). Theoretisch sollte die Fluoreszenzanisotropie bei Verdrängung der fluoreszierenden Lactose **67** aus den Bindungstaschen von ECL abnehmen. Bei niedrigen Konzentrationen an LacNAc-PNA•DNA-Komplex blieb die Fluoreszenzanisotropie nahezu konstant, stieg jedoch für Konzentrationen größer 5 μM nahezu proportional zur Konzentration an. Eine Erklärung für den Anstieg der Fluoreszenzanisotropie könnte zum Beispiel sein, dass die LacNAc-PNA•DNA-Komplexe die Affinität der FAM-markierten Lactose **67** erhöhten, z. B. indem sie eine Konformationsänderung in ECL induzierten, die dies begünstigte. Bedenkt man jedoch die hohe Konzentration an ECL ist ein anderes Szenario wahrscheinlicher. In diesem banden die bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexe nicht nur intramolekular an ein ECL-Molekül, sondern

intermolekular an zwei (siehe Abbildung 37E). Wenn zudem in einer der Bindungstaschen Lac~FAM **67** gebunden war, würde der damit verbundene Massenanstieg ebenfalls mit einem Anstieg der Fluoreszenzanisotropie verbunden gewesen sein.

Bei der Untersuchung des Bindungsverhaltens der bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexe gegenüber ECL konnten bereits mittels ELLA (siehe Kapitel 4.8.2.2) keine intramolekularen Wechselwirkungen nachgewiesen werden. Stattdessen wurde monovalentes Binden an ECL beobachtet. In dem hier beschriebenen, homogenen Fluoreszenzanisotropie-Assay konnten ebenfalls keine intramolekularen Wechselwirkungen detektiert werden. Im Gegensatz zu dem ELLA wurde jedoch vornehmlich intermolekulare Aggregation beobachtet. Eine Bestimmung der Bindungsaffinitäten war dadurch nicht möglich. Bei einer direkten Bestimmung der Dissoziationskonstanten via Fluoreszenzanisotropie wäre zwar die Konzentration an LacNAc-PNA•DNA-Komplex derart gering, dass es vermutlich nicht zur intermolekularen Aggregation käme, doch wäre dafür der Verbrauch an Lektin sehr hoch. Eine Alternative hierfür stellen SPR-basierte Assays dar. SPR zeichnet sich dadurch aus, dass sowohl die Dissoziationskonstanten direkt bestimmt werden können als auch der Verbrauch an Lektin sehr gering ist (siehe Kapitel 4.8.4.1).

4.8.4 SPR-basierter Assay

4.8.4.1 Prinzip des SPR-basierten Assays

SPR-Biosensoren ermöglichen die Untersuchung von molekularen Interaktionen ohne dabei auf die Anwesenheit von Reportergruppen angewiesen zu sein, d. h. eine Modifikation der beteiligten Bindungspartner, z. B. mit Fluorophoren oder Radiomarkern, ist nicht erforderlich. Ein weiterer großer Vorteil liegt in der geringen Substanzmenge, die für die Messungen erforderlich ist. Außerdem können die Wechselwirkungen in Echtzeit verfolgt werden und die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten direkt aus den erhaltenen Messkurven (Sensorgrammen) berechnet werden.

Das Kernstück des SPR-Spektrometers ist eine etwa 50 nm dicke Goldfolie, auf der ein halbkreisförmiges Glasprisma aufliegt.^[125] Auf der anderen Seite der Goldfolie grenzt eine Flusskammer an (siehe Abbildung 38). In das Prisma wird parallel zur Einfallsebene polarisiertes Licht eingestrahlt. Der Einfallswinkel ist dabei so gewählt, dass das Licht an der Grenzfläche zwischen Prisma und Goldoberfläche total reflektiert wird. Bei einem bestimmten Einfallswinkel kommt es zudem an der Oberfläche der angrenzenden Goldfolie zur Anregung von Oberflächenplasmonen (Dichteschwankungen der Elektronen). Die Photonen werden in Oberflächenplasmonen umgewandelt und das reflektierte Licht wird ausgelöscht. Da der Winkel, bei dem dies geschieht, stark vom Brechungsindex des angrenzenden Mediums in der Flusskammer abhängt, können Schwan-

kungen im Brechungsindex des Mediums durch eine winkelabhängige Detektion der Intensität des reflektierten Lichts registriert werden.^[126-127]

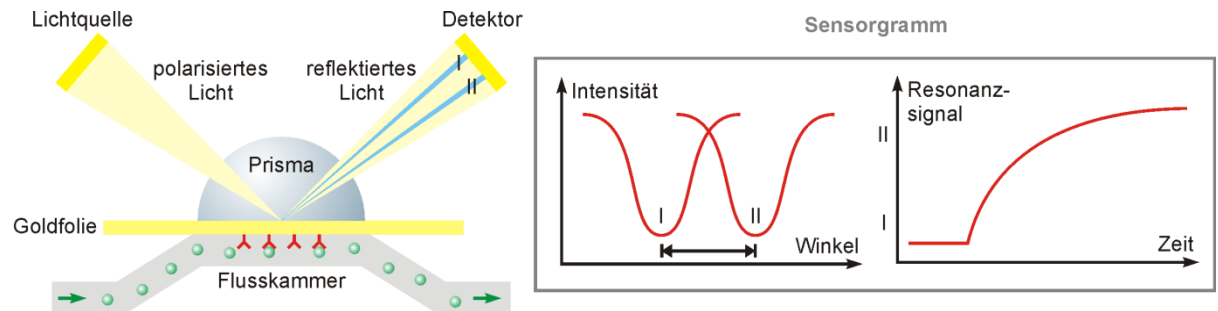


Abbildung 38: Aufbau eines SPR-Spektrometers.

Wie bereits erwähnt, befindet sich auf einer Seite der Goldfolie eine Flusskammer. In dieser können Interaktionen nahe der Goldoberfläche in Echtzeit verfolgt werden. Dazu wird ein Wechselwirkungspartner auf der Goldoberfläche immobilisiert, während der andere (Analyt) in gelöster Form über die Goldoberfläche geleitet wird. Kommt es dabei zu einer Wechselwirkung zwischen beiden, reichert sich der Analyt aus der Lösung an der Oberfläche an. Dadurch ändert sich die Dichte der Lösung nahe der Goldoberfläche, und damit verbunden, der Brechungsindex. Je mehr Moleküle miteinander wechselwirken, desto größer ist die Änderung des Brechungsindex. Eine Änderung von 0.1° entspricht 1000 RU (response units). Trägt man diese Änderung als Funktion der Zeit auf, erhält man ein sogenanntes Sensorgramm (siehe Abbildung 39).

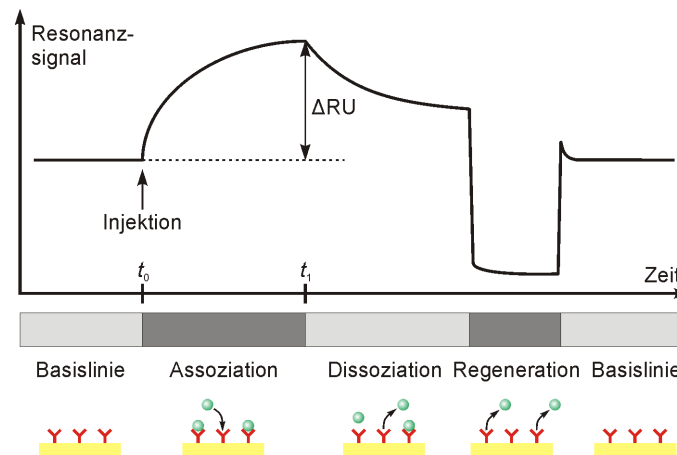


Abbildung 39: Verlauf einer SPR-Messung und das dazugehörige Sensorgramm.

Eine SPR-Messung besteht aus einer Assoziations-, Dissoziations- und Regenerationsphase (siehe Abbildung 39). In der Assoziationsphase wird der Analyt über die Oberfläche geleitet und lagert sich, infolge der Wechselwirkung, an diese an. Das Signal steigt bis zur Gleichgewichtseinstellung an. Während der anschließenden Dissoziationsphase wird Analyt-freier Puffer über die Oberfläche geleitet. Zuvor angelagerte Analytmoleküle dissoziieren von der Oberfläche, das Signal nimmt ab. Da die Dissoziation mitunter sehr langsam verläuft, wird diese in einer abschließenden Regenerationsphase „erzwungen“ indem z. B. der pH-Wert des Mediums geändert

wird oder Metallionen zugesetzt werden, welche die Bindungen aufbrechen. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass zu Beginn der nachfolgenden Messung identische Bedingungen vorliegen.^[127]

Die SPR-Messungen zur Untersuchung der Bindungsaffinitäten von ECL, RCA₁₂₀ und ConA wurden in Kooperation mit Dr. Jens Darnedde (Charité – Universitätsmedizin Berlin, Deutschland) durchgeführt.^[128] Dabei wurde sich an den Arbeiten von Haseley & Talaga *et al.*^[129] orientiert. Die Lektine wurden immobilisiert und eine Lösung der Kohlenhydrat-PNA•DNA-Komplexe darüber geleitet. Es wurden Sensor-Chips verwendet, die mit einer carboxymethylierten Dextran-Matrix beschichtet waren. Für die Immobilisierung wurden die Carboxyl-Gruppen der Dextran-Matrix mit *N*-Hydroxysuccinimid und EDC aktiviert und das Lektin in einer schwach sauren Lösung (pH 4.5) darüber geleitet, wobei sich kovalente Amid-Bindungen zwischen Lektin und Dextran-Matrix ausbildeten. Die Menge an immobilisiertem Lektin war dabei ein kritischer Faktor bei den Messungen (siehe Kapitel 4.8.4.2). Ein Signalanstieg von 1 RU bei der Beschichtung der Oberfläche entspricht ca. 1 pg·mm⁻² an immobilisiertem Lektin.^[130] Nicht umgesetzte NHS-Aktivester wurden mit Ethanolamin blockiert. Die Referenzzelle wurde analog der Messzelle mit Lektin beschichtet, dieses aber im Anschluss daran mit 6 M Guanidinhydrochlorid-Lösung denaturiert.

Zur Ermittlung der Bindungsparameter wurden die Sensorgramme an das Langmuir-Modell (1:1-Bindung)^[131] angeglichen. Sofern es bei den Messungen zur Gleichgewichtseinstellung kam, wurde zusätzlich auch die Steady-State-Kinetik^[132] angewendet und die Ergebnisse mit denen der Langmuir-Kinetik verglichen. Auf diese Weise konnten etwaige Ungenauigkeiten infolge eines ungeeigneten, theoretischen Modells aufgedeckt werden.

4.8.4.2 Untersuchungen zur Bindungsaffinität von ECL mittels SPR

Zu Beginn der SPR-Messungen^[128] wurden ca. 2700 RU ECL auf der Goldoberfläche immobilisiert. Anschließend wurde Asialofetuin, ein Glykoprotein mit neun Lactose-Liganden,^[117] über das immobilisierte Lektin geleitet und das Bindungsverhalten untersucht. Asialofetuin diente dabei als Kontrollsubstrat, da dessen Wechselwirkung mit ECL bereits mehrfach untersucht worden ist.^[124] In Abbildung 40 sind die erhaltenen Sensorgramme dargestellt. Da sich kein Gleichgewicht in der Assoziationsphase einstellte, konnte die Steady-State-Kinetik nicht zur Berechnung der kinetischen Parameter herangezogen werden. Eine Angleichung der Daten an das Langmuir-Modell war hingegen möglich, allerdings mit einer großen Ungenauigkeit verbunden ($\chi^2 = 199$). Demnach betrug die Dissoziationskonstante 0.6 μ M. Von der Kurvenform können ebenfalls Rückschlüsse auf das Bindungsverhalten gezogen werden. So erkennt man, dass die Bindungstaschen von ECL nur langsam während der Assoziationsphase gesättigt wurden. Außerdem dissoziierte Asialofetuin nur langsam wieder ab, sobald es an ECL gebunden hatte.

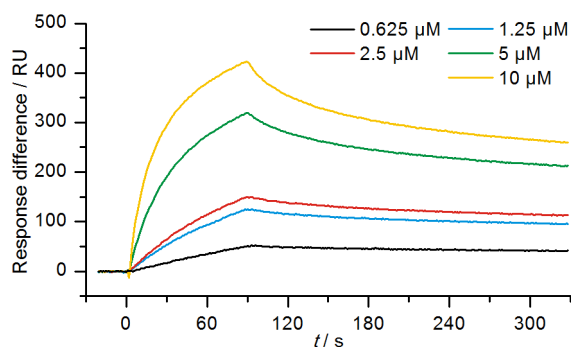


Abbildung 40: SPR-Sensorgramme, welche die Wechselwirkung zwischen Asialofetuin und immobilisiertem ECL (2700 RU) zeigen. Die Konzentration an Asialofetuin wurde variiert (0,625→10 µM). (Bedingungen: Flussrate = 20 µL·min⁻¹, 90 s Assoziation, 240 s Dissoziation, Puffer: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, pH 7.4)

Anschließend wurde der Einfluss der Valenz der multivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexe auf das Bindungsverhalten untersucht (siehe Abbildung 41 und Tabelle 7). Erwartungsgemäß zeigte der PNA•DNA-Komplex ohne LacNAc-Liganden (**L00**) keine Bindungsaffinität gegenüber ECL. Wechselwirkungen zwischen dem PNA•DNA-Gerüst und dem Lektin konnten demnach ausgeschlossen werden. Durch Einführung von LacNAc-Liganden stieg die Affinität schrittweise an. Da bei einigen Komplexen die Assoziationsphase zu kurz für die Einstellung eines Gleichgewichts war und folglich keine Steady-State-Kinetik angenommen werden konnte, wurden die Komplexe anhand der kinetischen Daten des Langmuir-Modells miteinander verglichen.

Der monovalente LacNAc-PNA•DNA-Komplex **L11** ging eine Bindung mit ECL ein, wenn auch nur mit geringer Affinität ($K_D = 800$ µM). Durch Einführung eines zweiten LacNAc-Liganden (Komplex **L05**) erhöhte sich die relative Bindungsaffinität pro LacNAc-Ligand auf das 33-fache. Die LacNAc-Liganden des tri- und tetravalenten Komplexes **L12** bzw. **L13** wiesen eine um den Faktor 102 bzw. 182 höhere Affinität auf als in dem monovalenten Komplex **L11**. Interessanterweise hatte der polyvalente Komplex **L14**, welcher durch Hybridisierung von PNA-Strängen mit überhängenden Enden erzeugt wurde, verringerte Dissoziations- und Assoziationskonstanten. Das

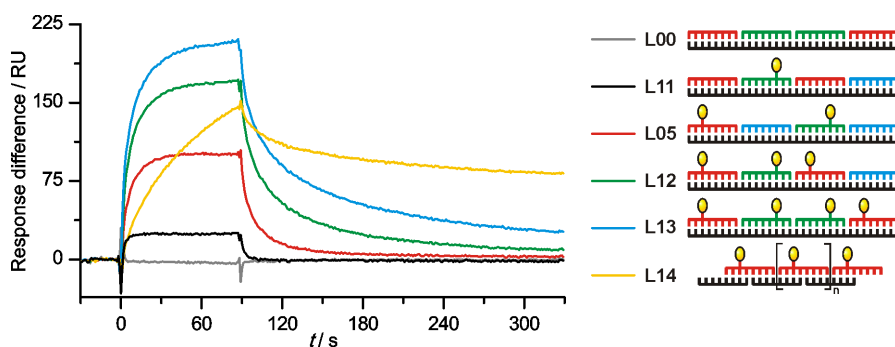




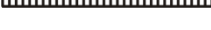



Abbildung 41: SPR-Sensorgramme, welche die Wechselwirkung zwischen verschiedenen LacNAc-PNA•DNA-Komplexen ($c = 10$ µM) und immobilisiertem ECL (2700 RU) zeigen. (Bedingungen: Flussrate = 20 µL·min⁻¹, 90 s Assoziation, 240 s Dissoziation, Puffer: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, pH 7.4)

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 7: Bindungsparameter für die Wechselwirkung zwischen mono-, bi-, tri-, tetra- und polyvalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexen und immobilisiertem ECL (2700 RU).

Komplex	Langmuir-Modell			Steady-State-Modell	
	$k_a / \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	k_d / s^{-1}	$K_D / \mu\text{M}$	Relative Bindungsstärke pro LacNAc	$K_D / \mu\text{M}$
L00 	[a]	[a]	[a]	[a]	[a]
L11 	$4.0 \cdot 10^2$	$3.2 \cdot 10^{-1}$	800	1	407
L05 	$4.1 \cdot 10^3$	$5.0 \cdot 10^{-2}$	12	33	36
L12 	$6.0 \cdot 10^3$	$1.5 \cdot 10^{-2}$	2.6	102	[b]
L13 	$6.8 \cdot 10^3$	$7.7 \cdot 10^{-3}$	1.1	182	[b]
L14 	$9.4 \cdot 10^2$	$2.3 \cdot 10^{-3}$	2.5	[c]	[b]

[a] keine Bindung; [b] Datenangleichung nicht durchführbar; [c] nicht bestimmbar, da genaue Valenz unbekannt. (k_a , Assoziationsgeschwindigkeitskonstante; k_d , Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante; K_D , Dissoziationskonstante. Bedingungen: Flussrate = $20 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 90 s Assoziation, 240 s Dissoziation, Puffer: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , pH 7.4)

Bindungsverhalten glich dem von Asialofetuin (siehe Abbildung 40) und ist auch für andere hochvalente Glykocluster bekannt.^[133-134] Die relativ hohe Dissoziationskonstante von Komplex **L14** rührte vermutlich von der Tatsache her, dass diese sich auf die Konzentration an DNA-Templat bezog und die Polymerisation nicht berücksichtigte.

Durch die Erhöhung der Valenz konnte demnach eine beeindruckende Affinitätssteigerung erreicht werden. Obwohl die größte Zunahme beim Übergang von mono- zu bivalenter Präsentation auftrat, konnte die Affinität durch Einführung weiterer Liganden noch erheblich gesteigert werden. Der tetravalente Komplex **L13** band mit einer Dissoziationskonstante von $1.1 \mu\text{M}$ an ECL.

Als nächstes wurde die Abstandsabhängigkeit der bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexe auf das Bindungsverhalten untersucht. In den Komplexen **L01** – **L11** wurde der Abstand zwischen den LacNAc-Liganden sukzessive von 42 \AA auf 146 \AA erhöht. Dabei zeigte sich, dass nahezu keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Komplexen bestanden, unabhängig von dem Modell, dass für die Datenangleichung herangezogen wurde (Abbildung 42, gestrichelte Linien). Grund dafür war vermutlich die Tatsache, dass die bivalenten Substrate nicht nur intramolekular mit den beiden Bindungstaschen eines einzelnen ECL-Moleküls, sondern auch intermolekular mit den Bindungstaschen von benachbarten ECL-Molekülen wechselwirken konnten. Letzteres führte zu einer Verbrückung von mehreren Lektin-Molekülen, ein Phänomen das auch als Aggregation bezeichnet wird und insbesondere bei hohen Lektin-Konzentrationen auftreten kann. Um diesem Phänomen entgegenzuwirken, wurde die Beladung an ECL auf 700 RU reduziert und das Experiment erneut durchgeführt.

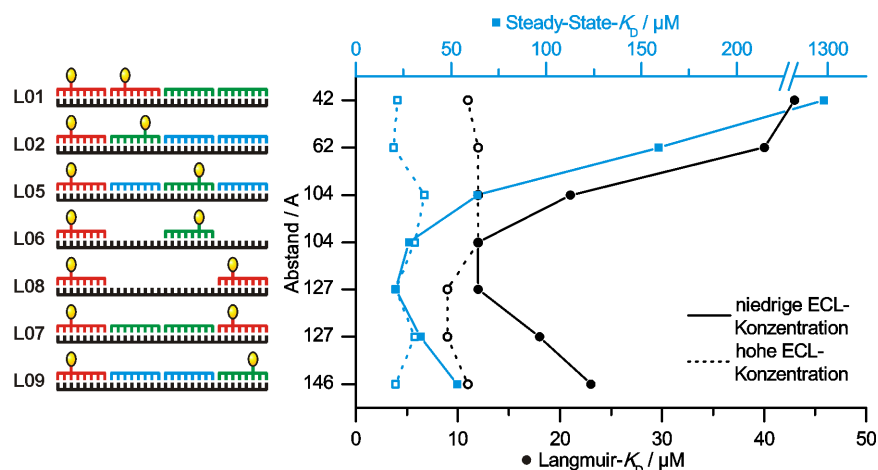


Abbildung 42: Abstandseinfluss der bivalenten LacNac-PNA•DNA-Komplexe **L01**, **L02** und **L05 – L09** auf die Bindungsaffinität gegenüber ECL (700 bzw. 2700 RU). (Bedingungen: Flussrate = 20 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 90 s Assoziation, 240 s Dissoziation, Puffer: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , pH 7.4)

Tatsächlich offenbarte die geringere Beladung eine Abstandsabhängigkeit zwischen den bivalenten Komplexen **L01**, **L02**, **L05**, **L07** und **L09** bezüglich der Bindungsaffinität gegenüber ECL (Abbildung 42, durchgezogene Linien). Die Dissoziationskonstante nahm bei Erhöhung des Abstandes von 42 Å auf 104 Å ab, erreichte ein Minimum, bevor eine weitere Erhöhung des Abstandes auf 146 Å wieder zu einem Anstieg der Dissoziationskonstante führte. Dieser Trend wurde sowohl bei Berechnung der Dissoziationskonstanten nach dem Langmuir- als auch dem Steady-State-Modell erhalten, wenngleich die relativen Unterschiede zwischen den Komplexen bei letzterem Modell größer waren. Obwohl die Werte je nach verwendetem Modell teilweise stark voneinander abwichen, waren beide Modelle gleichermaßen für eine Datenangleichung geeignet.

Das Minimum der Dissoziationskonstanten konnte auf eine räumliche Anordnung der LacNac-Liganden zurückgeführt werden kann, welche dem der zwei Bindungstaschen von ECL (ca. 100 Å) nahe kam. Ursache für die verringerte Affinität bei kürzeren Abständen war die Tatsache, dass diese Komplexe nicht in der Lage waren, simultan an beide Bindungstaschen von ECL zu binden. Eine bivalente Wechselwirkung war stattdessen nur durch Verbrückung von mehreren ECL-Molekülen möglich. Die geringere Wahrscheinlichkeit dafür bei niedriger Beladung äußerte sich in der erhöhten Dissoziationskonstante. Komplexe, welche die optimale LacNac-Anordnung überschritten, waren prinzipiell noch in der Lage, simultan an beide Bindungstaschen eines ECL-Moleküls zu binden, jedoch nur wenn diese eine energetisch ungünstige Konformation annahmen, d. h. auf Kosten von Biegespannung. Zugleich nahm mit steigendem Abstand die Wahrscheinlichkeit für intermolekulare Wechselwirkungen (Verbrückung) zu, wodurch die geringere Affinität teilweise kompensiert werden konnte. Dies würde erklären weshalb die Dissoziationskonstanten mit zunehmendem Abstand nur moderat anstiegen.

In Kapitel 4.8.1 wurde bereits erklärt, dass die Bindungstaschen von ECL auf entgegengesetzten Seiten des Proteins liegen. Damit ein Substrat simultan an beide Bindungstaschen binden kann, müsste es in der Lage sein, sich um das Lektin herumzubiegen. Die bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexe **L01**, **L02**, **L05**, **L07** und **L09** hatten, aufgrund der Einzelstrangbrüche, bereits eine erhöhte Flexibilität gegenüber durchgängigen PNA•DNA-Duplexen. Um den Einfluss einer weiteren Erhöhung der Substratflexibilität zu untersuchen, wurden auch die Affinitäten der Komplexe **L06** und **L08** gegenüber ECL bestimmt. Beide Komplexe besaßen Einzelstrangabschnitte innerhalb des PNA•DNA-Duplex. Tatsächlich wurden in diesem Fall die kleinsten Dissoziationskonstanten aller getesteten bivalenten Substrate bestimmt. Da einzelsträngige, ungepaarte Regionen biegsamer sein sollten als durchgängig gepaarte Regionen mit Einzelstrangbrüchen, war es nur plausibel anzunehmen, dass die flexiblen Komplexe **L06** und **L08** die gebogene Form, die für die simultane Bindung beider Bindungstaschen eines ECL-Moleküls nötig war, leichter einnehmen konnten.

Im Unterschied zu dem ELLA (Kapitel 4.8.2) und dem Fluoreszenzanisotropie-Assay (Kapitel 4.8.3) konnte mittels des SPR-basierten Assays eine klare Abstandsabhängigkeit der Bindungsaffinität gegenüber ECL, welche zudem in Übereinstimmung mit der Kristallstruktur^[111] war, detektiert werden. Betrachtet man die Literatur, so wurde ECL bisher nur selten Gegenstand einer räumlichen Rasterung. Eine der wenigen Untersuchungen wurde von Cecioni *et al.* durchgeführt.^[114] Dabei wurden Galactose-Liganden an verschiedene Gerüste angebracht und die Auswirkungen auf die Bindungsaffinität studiert. Sowohl die Geometrie als auch die Flexibilität der Gerüste beeinflussten das Bindungsverhalten. Die exakten Abstände zwischen den Liganden waren allerdings nur eingeschränkt zugänglich. Ein weiterer großer Nachteil war zudem die Tatsache, dass jedes Gerüst eine separate Synthese erforderte. Mit dem hier beschriebenen modularen Aufbau konnte jedoch, mit relativ geringem Aufwand, eine Vielzahl an multivalenten Komplexen mit unterschiedlicher Geometrie und Flexibilität erzeugt werden. Die Struktur der LacNAc-PNA•DNA-Komplexe war zudem hoch definiert und sehr gut vorhersagbar.

4.8.4.3 Untersuchungen zur Bindungsaffinität von RCA₁₂₀ mittels SPR

Die Wechselwirkung zwischen den bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexen und ECL wurde mit Hilfe von drei verschiedenen Bindungsassays untersucht, doch nur bei Verwendung des SPR-basierten Assays (siehe Kapitel 4.8.4.2) war es möglich, eine intramolekulare Bindung an beide Bindungstaschen von ECL nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde das Bindungsverhalten der LacNAc-PNA•DNA-Komplexe gegenüber RCA₁₂₀ nur mit dem SPR-basierten Assay untersucht. Um die Wahrscheinlichkeit für intermolekulare Wechselwirkungen zu verringern, wurde der Beladungsgrad an RCA₁₂₀ so gering wie möglich gewählt. Andererseits musste beachtet werden, dass im Zuge einer geringeren Beladung auch die Signalstärke abnimmt, wenngleich diesem

Umstand durch Erhöhung der Konzentration an LacNAc-PNA•DNA-Komplex begegnet werden kann. Da die Konzentration an LacNAc-PNA•DNA-Komplex jedoch nicht beliebig erhöht werden konnte (siehe Kapitel 4.7), wurden ca. 300 RU RCA₁₂₀ immobilisiert.

Analog den SPR-Bindungsstudien mit ECL (siehe Kapitel 4.8.4.2) wurde zunächst der Einfluss der Valenz auf das Bindungsverhalten der LacNAc-PNA•DNA-Komplexe untersucht. Zu Beginn wurde der bivalente Man-PNA•DNA-Komplex **M05** über das immobilisierte Lektin geleitet. Die Tatsache, dass dieser keine Affinität gegenüber RCA₁₂₀ aufwies (siehe Abbildung 43), war einerseits ein Beleg für die Bindungsspezifität von RCA₁₂₀ gegenüber *N*-Acetyllactosamin bzw. Galactose, andererseits auch dafür, dass das PNA•DNA-Gerüst nicht mit dem Lektin wechselwirkte. Anschließend wurden stufenweise LacNAc-Liganden in die Komplexe eingeführt und die Affinitäten bestimmt. Im Unterschied zu der Wechselwirkung mit ECL trat selbst bei dem tri-, tetra- und polyvalenten Komplex bereits nach kurzer Zeit ein Gleichgewichtszustand bei der Assoziation ein. Die Dissoziationskonstanten konnten demnach unter Verwendung des Steady-State-Modells berechnet werden. Im Gegensatz dazu war eine Angleichung der Daten an das Langmuir-Modell nicht für alle Komplexe möglich. Aus diesem Grund wurden für den Vergleich der Komplexe untereinander die Dissoziationskonstanten, die nach dem Steady-State-Modell berechnet wurden, herangezogen.

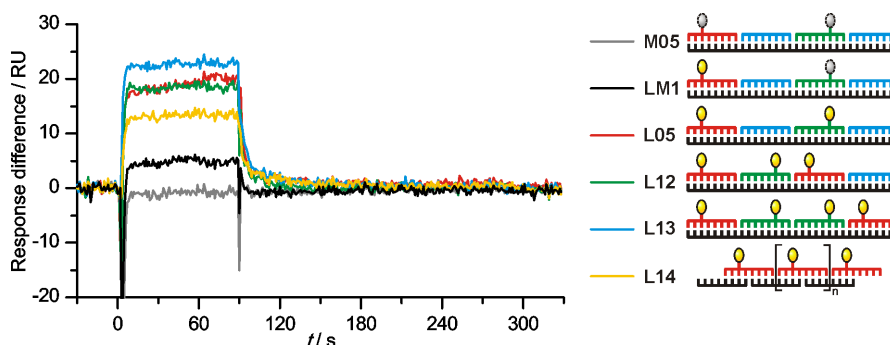








Abbildung 43: SPR-Sensorgramme, welche die Wechselwirkung zwischen verschiedenen LacNAc-PNA•DNA-Komplexen ($c = 10 \mu\text{M}$) und immobilisiertem RCA₁₂₀ (300 RU) zeigen. (Bedingungen: Flussrate = $20 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 90 s Assoziation, 240 s Dissoziation, Puffer: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, pH 7.4)

Wie bereits erwähnt, wies der bivalente Man-Komplex **M05** keine Affinität gegenüber RCA₁₂₀ auf. Wurde hingegen ein Man-Ligand durch *N*-Acetyllactosamin ausgetauscht, stieg die Affinität, wenn auch nur schwach, an (siehe Abbildung 43 und Tabelle 8). Der gebildete heterobivalente LacNAc/Man-PNA•DNA-Komplex **LM1** hatte eine Dissoziationskonstante von $256 \mu\text{M}$. (Die geringe Affinität, und damit verbunden, das geringe Signal, war auch der Grund dafür, dass die Daten nicht an das Langmuir-Modell angeglichen werden konnten.) Beim Austausch des zweiten Man-Liganden durch LacNAc stieg die Affinität stark an ($K_D = 8.2 \mu\text{M}$). In dem bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplex **L03** war die Bindungsstärke pro LacNAc-Ligand 15 Mal höher als in dem

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 8: Bindungsparameter für die Wechselwirkung zwischen mono-, bi-, tri-, tetra- und polyvalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexen und RCA₁₂₀.

Komplex	Langmuir-Modell			Steady-State-Modell	
		$k_a / \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	k_d / s^{-1}	$K_D / \mu\text{M}$	Relative Bindungsstärke pro LacNAc
M05 		[a]	[a]	[a]	[a]
LM1 		[b]	[b]	256	1
L05 		$1.6 \cdot 10^4$	$2.3 \cdot 10^{-1}$	14	15
L12 		$6.2 \cdot 10^4$	$1.7 \cdot 10^{-1}$	2.7	16
L13 		$8.2 \cdot 10^4$	$6.1 \cdot 10^{-2}$	0.7	24
L14 		$1.8 \cdot 10^4$	$2.7 \cdot 10^{-2}$	1.6	[c]

[a] keine Bindung; [b] Datenangleichung nicht durchführbar; [c] nicht bestimmbar, da genaue Valenz unbekannt. (k_a , Assoziationsgeschwindigkeitskonstante; k_d , Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante; K_D , Dissoziationskonstante. Bedingungen: Flussrate = $20 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 90 s Assoziation, 240 s Dissoziation, Puffer: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, pH 7.4)

monovalenten Komplex **LM1**. Durch weitere Erhöhung der Ligandenzahl auf tri- und tetravalente Präsentation stieg die relative Bindungsstärke je LacNAc-Ligand auf den Faktor 16 bzw. 24 an. Wie bereits bei der Wechselwirkung mit ECL war die berechnete Dissoziationskonstante des polyvalenten Komplexes **L14** etwas kleiner als die des tetravalenten Komplexes **L13**. Grund dafür war vermutlich erneut, dass der K_D -Berechnung die Konzentration des DNA-Templats zugrunde lag und nicht die tatsächliche Konzentration an gebildetem Komplex **L14**.

Beim Vergleich der Ergebnisse mit denen von ECL (vergleiche Tabelle 8 mit Tabelle 7 aus Kapitel 4.8.4.2) fällt auf, dass die Erhöhung der Valenz im Fall von RCA₁₂₀ einen geringeren Effekt auf die Affinität hatte als bei ECL. Führte der Übergang von mono- zu tetravalenter Präsentation bei ECL noch zu einer relativen Bindungsverstärkung pro LacNAc-Ligand von 182, betrug diese bei RCA₁₂₀ nur 24. Maßgeblich verantwortlich dafür war die Tatsache, dass bei der Bindung an ECL die Erhöhung von mono- zu bivalenter Präsentation zu einer wesentlich stärkeren, relativen Affinitätssteigerung führte als bei RCA₁₂₀ (33-fach gegenüber 15-fach). Beim Übergang zu tri- bzw. tetravalenter Präsentation war die Affinitätssteigerung ebenfalls bei ECL größer, allerdings war der Unterschied zu RCA₁₂₀ nicht mehr so stark ausgeprägt. Des Weiteren waren die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten bei der Bindung an RCA₁₂₀ jeweils eine Größenordnung größer als bei ECL, d. h. die Komplexe banden schneller daran, lösten sich aber auch schneller wieder davon ab. Am größten war der Unterschied bei dem polyvalenten Komplex **L14**. Die hohen Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten führten dazu, dass bei der Bindung an RCA₁₂₀ schnell eine Sättigung der Bindungsstellen eintrat, selbst bei dem tri-, tetra- und polyvalenten Komplex.

Als nächstes wurde der Einfluss des Abstandes zwischen zwei präsentierten Liganden auf das Bindungsverhalten untersucht (siehe Abbildung 44). Die kinetischen Parameter wurden nach dem Langmuir- und dem Steady-State-Modell berechnet. Beide Modelle erzeugten ähnliche Tendenzen beim Bindungsverhalten, bis auf eine Ausnahme (Komplex **L05** und **L06**).

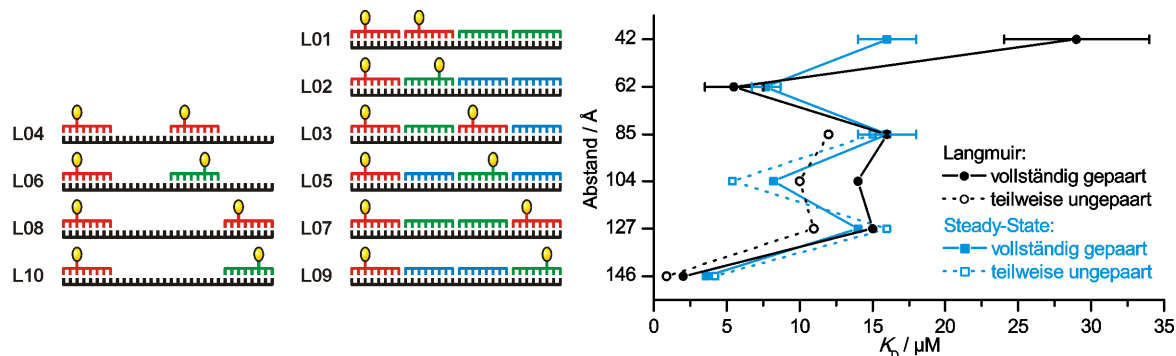


Abbildung 44: Abstandseinfluss der bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexe auf die Bindungsaffinität gegenüber RCA₁₂₀. Für die Komplexe **L01** – **L03** sind jeweils der Mittelwert aus 2 – 3 unabhängigen Experimenten sowie die Standardabweichung angegeben. (Bedingungen: Flussrate = 20 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 90 s Assoziation, 240 s Dissoziation, Puffer: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, pH 7.4)

Zunächst werden die Ergebnisse des Langmuir-Modells betrachtet (durchgezogene, schwarze Kurve in Abbildung 44). Der Komplex mit dem kürzesten Abstand (**L01**) hatte die niedrigste Affinität. Bei Verlängerung des Abstandes auf 62 Å (Komplex **L02**) nahm die Affinität zu, fiel für Abstände zwischen 85 und 127 Å wieder ab (Komplexe **L03**, **L05** und **L07**) und erreichte für einen Abstand von 146 Å (**L09**) den höchsten Wert aller bivalenten Komplexe. Die Begründung für die niedrigste (**L01**) und die höchste Affinität (**L09**) folgt der Argumentation für die Bindung an ECL (siehe Kapitel 4.8.4.2). Demnach war Komplex **L01**, aufgrund des zu kurzen Abstandes von 42 Å zwischen den Liganden, nicht in der Lage simultan an beide Bindungstaschen von RCA₁₂₀ zu binden. Sofern der Komplex keine intermolekularen Wechselwirkungen einging, d. h. zwei benachbarte RCA₁₂₀-Moleküle verbrückte, war er auf monovalentes Binden beschränkt.

Komplex **L09** präsentierte die Liganden hingegen in einem Abstand, der eine intramolekulare, bivalente Bindung an RCA₁₂₀ ermöglichte. Dessen Abstand von 146 Å stimmte annähernd mit dem aus der Kristallstruktur bestimmten (ca. 130 Å) überein. Die Affinitäten der Komplexe, welche die Liganden in Abständen zwischen 42 und 146 Å präsentierten (**L03**, **L05** und **L07**), lagen zwischen diesen beiden Extrema. Diese Komplexe konnten zwar nicht intramolekular an RCA₁₂₀ binden, hatten jedoch, aufgrund des längeren Abstandes zwischen den Liganden, eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Eingehen einer intermolekularen Bindung. Allerdings wich die starke Affinitätszunahme für Komplex **L02** hiervon ab. Obwohl der Abstand in diesem Komplex relativ kurz war, hatte dieser die zweithöchste Affinität aller bivalenten Komplexe. Laut Kristallstruktur reichte dieser Abstand nicht für eine intramolekulare Bindung aus, jedenfalls nicht an die Bindungstaschen der beiden B-Untereinheiten von RCA₁₂₀. Ein Grund für die erhöhte

Affinität könnte allerdings gewesen sein, dass ein Ligand an eine primäre Bindungstasche und der andere Ligand an eine sekundäre Bindungstasche von RCA₁₂₀ band. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits für andere multivalente Proteine gemacht.^[135-136] In diesen Fällen wurde ebenfalls der Abstand zwischen zwei Liganden variiert und dabei zwei Affinitätsmaxima registriert. Während ein Maximum auf der bivalenten Bindung an zwei primäre Bindungstaschen beruhte, wurde das zweite Maximum dem bivalenten Binden an eine primäre und eine sekundäre Bindungstasche zugeschrieben. Diese sekundären Bindungstaschen waren nicht in der Literatur dokumentiert, konnten jedoch mit Hilfe von Computersimulationen identifiziert werden. Einen ersten Hinweis darauf, dass ein ähnlicher Fall auch hier vorliegen könnte, ergibt sich aus der Kristallstruktur von RCA₁₂₀.^[75]

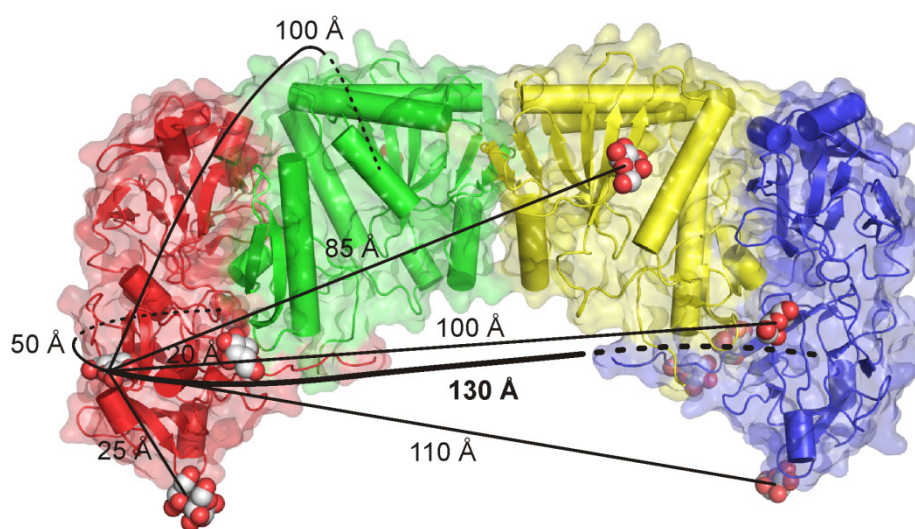


Abbildung 45: Kristallstruktur von RCA₁₂₀ mit elf Molekülen Galactose (1rzo.pdb).^[75] Der Abstand zwischen den beiden primären Bindungstaschen ist hervorgehoben. Außerdem sind die Abstände zu potentiellen sekundären Bindungstaschen angegeben.

Obwohl für RCA₁₂₀ nur zwei primäre Bindungstaschen in der Literatur^[74] beschrieben sind, konnte in der Kristallstruktur von RCA₁₂₀^[75] die Elektronendichte von elf Galactose-Molekülen aufgelöst werden (siehe Abbildung 45). Jene Galactose-Moleküle, die sich nicht in den primären Bindungstaschen befanden, waren 20, 25, 50, 85, 100, 105 und 110 Å (ermittelt unter Berücksichtigung der Tatsache, dass ein bivalentes Substrat unter Umständen eine gebogene Konformation einnehmen muss) von diesen entfernt. Auch wenn dies keinen eindeutigen Beweis darstellt, so deutet der Befund, dass es zumindest im Kristall Bereiche gibt, in denen sich Galactose-Moleküle bevorzugt aufhalten, auf die Existenz einer oder mehrerer sekundären Bindungstaschen hin, d. h. eines oder mehrere Galactose-Moleküle waren eventuell in sekundären Bindungstaschen gebunden. Unter Berücksichtigung des Abstandes zwischen den LacNAc-Liganden in dem bivalenten Komplex **L02** von 62 Å, handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit dabei um das Galactose-Molekül, welches 50 Å von der primären Bindungstasche entfernt war. Ein weiteres Indiz für die Existenz einer sekundären Bindungstasche ergibt sich aus den Arbeiten von

Kobayashi *et al.* (siehe Kapitel 2.5.2).^[72-73] Analog den Experimenten hier, wurden dabei multivalente Gal-DNA•DNA-Komplexe hergestellt und der Einfluss des Abstands zwischen den Gal-Liganden auf die Bindungsaffinität gegenüber RCA₁₂₀ untersucht. Die ermittelte Abstandsabhängigkeit stimmte in guter Näherung mit der hier beobachteten überein, d. h. bei einem Abstand von 63 Å war die Affinität am höchsten (Komplex **7**), während sie für kürzere oder längere Abstände (Komplexe **6** und **8**) geringer war. Allerdings sei an dieser Stelle angemerkt, dass die Komplexe die Gal-Liganden mehrfach in gleichbleibenden Abständen präsentierten. In Komplex **7** waren die Gal-Liganden z. B. 63, 126, 189 Å usw. voneinander entfernt. Demzufolge könnte die erhöhte Affinität von Komplex **7** auch von einer intramolekularen Bindung an die beiden primären Bindungstaschen herrühren. Weiterführende Experimente (z. B. MD-Simulationen) zur Bestätigung oder Widerlegung der Existenz einer sekundären Bindungstasche wurden, aufgrund des damit verbundenen Zeit- und Arbeitsaufwandes, jedoch nicht durchgeführt.

Bevor die Ergebnisse des Steady-State-Modells diskutiert werden, wird der Einfluss der Flexibilität auf das Bindungsverhalten analysiert (gestrichelte, schwarze Kurve in Abbildung 44). Demnach führte die Einführung von Einzelstrangabschnitten zu einer höheren Affinität (Komplexe **L04**, **L06**, **L08** und **L10**). Wie bereits in Kapitel 4.8.1 erläutert, musste ein bivalenter LacNAc-PNA•DNA-Komplex für eine intramolekulare Bindung an die zwei Bindungstaschen von RCA₁₂₀ eine leicht gebogene Konformation einnehmen. Folglich begünstigte eine höhere Flexibilität, ebenso wie bei der Bindung an ECL (siehe Kapitel 4.8.4.2), die Einnahme einer Konformation, in welcher die räumliche Orientierung der präsentierten Liganden jener der Bindungstaschen in RCA₁₂₀ entsprach.

Die kinetischen Parameter, die durch Angleichung der Daten an das Steady-State-Modell erhalten wurden (blaue Kurven in Abbildung 44), stimmten bis auf eine Ausnahme mit denen des Langmuir-Modells überein. Die Komplexe **L02** und **L09** wiesen je ein Affinitätsmaximum auf, wobei das von **L09** stärker ausgeprägt war. Komplexe mit davon abweichenden Abständen zwischen den Liganden (**L01**, **L03**, **L07**) wiesen eine niedrigere Affinität auf. Ebenso banden Komplexe mit Einzelstrangabschnitten stärker, oder mindestens genauso stark, wie ihre doppelsträngigen Pendants (vergleiche **L03**, **L05**, **L07**, **L09** mit **L04**, **L06**, **L08**, **L10**, Abbildung 44).

Bei der zu Beginn erwähnten Ausnahme bezüglich unterschiedlicher K_D -Werte je nach verwendetem kinetischen Modell handelte es sich um Komplex **L05**. Dessen Dissoziationskonstante war nach dem Steady-State-Modell wesentlich kleiner als nach dem Langmuir-Modell und befand sich auf dem Niveau von Komplex **L02** (siehe Abbildung 44, blaue Kurve). In der Reihe der Komplexe **L01**, **L02**, **L03**, **L05** und **L07** nahm die Affinität abwechselnd zu und wieder ab. Neben dem größer werdenden Abstand zwischen den präsentierten Liganden, variierte auch der Winkel zwischen diesen. Im Detail betrug dieser 4 – 12° für **L01**, **L03**, **L07** und 172 – 176° für **L02** und

L05. Allerdings waren diese Winkel, streng genommen, nur für durchgängige Doppelhelices gültig. Die hier betrachteten Komplexe wiesen hingegen Einzelstrangbrüche auf, welche gelenkartig das Drehen und Knicken ermöglichten.^[70] Gegen einen Einfluss des Winkels sprach auch, dass der Wechsel zwischen niedriger und hoher Affinität auch bei den flexiblen Komplexen **L04**, **L06** und **L08** auftrat. Wie in den MD-Simulationen in Kapitel 4.8.5 gezeigt, kann der Torsionswinkel in Komplexen mit Einzelstrangabschnitten stark von dem in einem durchgängigen Doppelstrang abweichen. Ein weiterer Unterschied zu **L04**, **L06** und **L08** war, dass in den Komplexen **L02** und **L05** ein LacNAc-PNA-Konjugat **82** durch **84** ersetzt war. So könnte die veränderte Sequenz von **84** zu zusätzlichen Wechselwirkungen geführt haben. Da der Man-PNA•DNA-Komplex **M05** keine Affinität für RCA₁₂₀ hatte (siehe Tabelle 8), müssen diese jedoch sehr schwach gewesen sein, zu schwach um diese via SPR beobachten zu können. Im Zusammenspiel mit einer stärkeren Bindung, in diesem Fall einem LacNAc-Liganden, könnten diese Wechselwirkungen jedoch durch multivalente Wechselwirkungsmechanismen verstärkt worden sein. Der resultierende Affinitätsgewinn wäre dann groß genug gewesen, um mittels SPR detektiert werden zu können.

Obwohl die kinetischen Parameter in Einzelfällen je nach verwendetem kinetischen Modell voneinander abwichen, stimmten die Tendenzen überein. Der Abstand zwischen den primären Bindungstaschen, wie er in der Kristallstruktur von RCA₁₂₀^[75] ermittelt wurde, konnte bestätigt werden. Außerdem wurde eine, bisher nicht dokumentierte, potentielle sekundäre Bindungstasche identifiziert. Damit konnte verdeutlicht werden, dass die LacNAc-PNA•DNA-Komplexe als molekulares Lineal für die räumliche Rasterung der Bindungsstellen von RCA₁₂₀ verwendet werden können, wenngleich das Potential von Nukleinsäuregerüsten zur exakten räumlichen Präsentation von Kohlenhydrat-Liganden bereits von Kobayashi und seinen Mitarbeitern aufgezeigt wurde.^[72-73] Im Unterschied zu diesen Arbeiten wurde bei den hier durchgeführten Experimenten jedoch ein größerer Abstandsbereich überprüft und außerdem, durch die Einführung von Einzelstrangabschnitten, der Einfluss der Gerüstflexibilität untersucht. Die Verwendung von Kohlenhydrat-PNA-Konjugaten statt Kohlenhydrat-DNA-Konjugaten erhöhte zudem die Stabilität der erzeugten Komplexe.

Bisherige Bindungsstudien mit RCA₁₂₀ beschränkten sich hauptsächlich auf den Einfluss der Valenz auf die Bindungsaffinität und ließen den der räumlichen Anordnung außer Acht. So verknüpften z.B. Gao *et al.* vier Lactose-Liganden über ein Galactose-Molekül miteinander und erhöhten dadurch die relative Bindungsaffinität je Lactose-Ligand um den Faktor 100.^[137] Maljaars *et al.* hingegen variierten nicht nur die Anzahl der Liganden sondern auch deren räumliche Anordnung, indem sie eine kleine Bibliothek an galactosylierten Peptiden herstellten.^[138] Obwohl neben der Ligandenanzahl auch die Peptidsequenz und damit verbunden, die räumliche Orien-

tierung der präsentierten Liganden, einen Einfluss auf die Bindungsaffinität hatte, konnten keine Schlüsse zwischen Orientierung und Affinität gezogen werden, da die Peptide relativ flexibel waren und deren räumliche Strukturen schwer vorhersagbar waren. Im Unterschied dazu waren die Strukturen der LacNAc-PNA•DNA-Komplexe in dieser Arbeit hoch definiert.

4.8.4.4 Untersuchungen zur Bindungsaffinität von Con A mittels SPR

Neben den LacNAc-bindenden Lektinen ECL und RCA₁₂₀ wurde auch Concanavalin A, welches spezifisch an Mannose bindet, mittels SPR untersucht. Bei den Messungen wurde jedoch beobachtet, dass das Signal im niedrigen Konzentrationsbereich an Man-PNA•DNA-Komplex sehr schwach war, während es bei höheren Konzentrationen unverhältnismäßig stark anstieg. Demzufolge musste erst eine bestimmte Konzentration an Man-PNA•DNA-Komplex vorliegen, bis es zu einer Wechselwirkung kam. Unterhalb dieses Schwellenwerts blieb die Bindung aus.

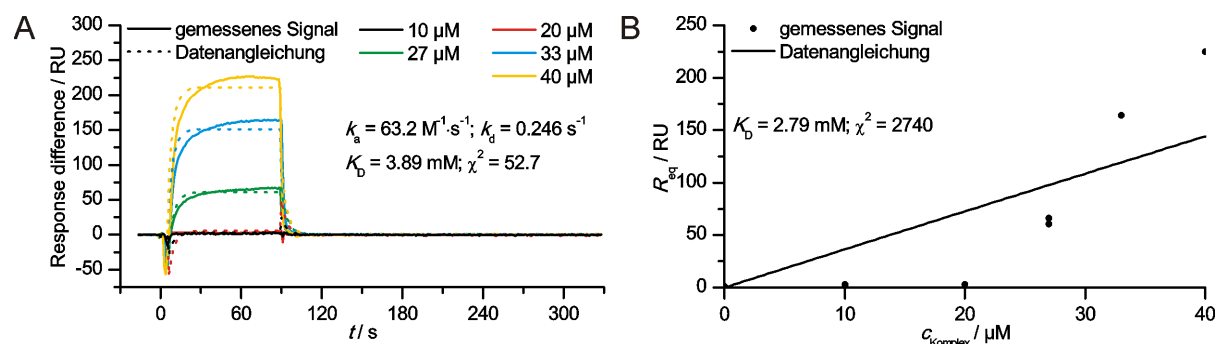


Abbildung 46: A) SPR-Sensorgramme, welche die Wechselwirkung zwischen dem bivalenten Man-PNA•DNA-Komplex **M07** und immobilisiertem ConA (1200 RU) zeigen. (Bedingungen: Flussrate = 20 µL·min⁻¹, 90 s Assoziation, 240 s Dissoziation, Puffer: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, pH 7.4). Die berechneten Kurven bei Angleichung an das Langmuir-Modell sind ebenfalls gezeigt. B) Graphische Darstellung von R_{eq} als Funktion der Komplexkonzentration zur Berechnung der Dissoziationskonstante nach dem Steady-State-Modell.

Die erhaltenen Daten ließen sich nur schlecht an die kinetischen Modelle anpassen. Die Güte der Datenanpassung war in allen Fällen gering ($\chi^2 \gg 10$), wobei die Abweichung zum Steady-State-Modell besonders groß war. Folglich war die Aussagekraft der berechneten kinetischen Parameter sehr gering. In Abbildung 46 sind exemplarisch die Sensorgramme des bivalenten Man-PNA•DNA-Komplexes **M07** sowie die Ergebnisse der Datenangleichungen gezeigt.

In der Literatur wurden häufig 7000 – 8000 RU ConA auf dem Goldchip immobilisiert.^[133, 139] Bei den Untersuchungen hier wurden jedoch nur 1200 RU ConA auf den Chip gebracht. Eine Erhöhung der Beladung hätte vermutlich zu einer Signalverbesserung geführt. Allerdings hätte dies unter Umständen auch zur Folge gehabt, dass eine Abstandsabhängigkeit aufgrund zu dichter Anordnung der ConA-Moleküle auf der Oberfläche verschwunden wäre (vergleiche mit SPR-Messungen an ECL, Kapitel 4.8.4.2). Außerdem schien eine zu geringe Signalstärke nicht der




Grund für die schlechte Datenanpassung gewesen zu sein, da diese bei hohen Konzentrationen ausreichend groß war.

4.8.5 Moleküldynamische Simulationen zur Untersuchung der Flexibilität

Zur Verifizierung der in Kapitel 4.8.4.2 gemachten Beobachtungen zum Einfluss der Flexibilität der bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexe auf das Bindungsverhalten gegenüber ECL wurden, in Kooperation mit Alexander Bujotzek und Dr. Marcus Weber (Zuse Institut Berlin, Deutschland), moleküldynamische Simulationen durchgeführt.^[128] Zu diesem Zweck wurden die Komplexe **L05**, **L06** und **L15** modelliert, welche alle die gleiche Anzahl an Nukleotiden zwischen den LacNAc-Liganden hatten. In Komplex **L15** waren die kurzen PNA-Stränge zu einem langen PNA-Strang verknüpft, d. h. das Rückgrat wies keine Einzelstrangbrüche auf. Die Sequenz war die gleiche wie in Komplex **L05**.

Ausgangspunkt für die MD-Simulationen war die lineare Konformation des PNA•DNA-Duplex basierend auf der publizierten NMR-Struktur.^[69] Nach 10 ns zur Gleichgewichtseinstellung wurde die Simulation für weitere 20 ns durchgeführt und während dieser Zeit die eingenommen Abstände und Winkel zwischen den Liganden erfasst (siehe Tabelle 9). Wenngleich die Simulationszeit vermutlich zu kurz war, um den Konformationsraum von derart großen Molekülen realistisch abzufragen, konnten erste Rückschlüsse bezüglich der Flexibilität der Komplexe gezogen werden. Bei dem rigidesten Komplex (**L15**) wich der mittlere Abstand zwischen den Liganden nur minimal von dem berechneten, kanonischen Abstand von 104 Å ab, während für die flexiblen Komplexe **L05** und **L06** eine Abweichung von 5 Å bestimmt wurde. Obwohl die Wahrscheinlichkeit für eine gebogene Konformation, d. h. einen kürzeren LacNAc-LacNAc-Abstand, für beide Komplexe erhöht war, verringerte sich der Abstand nur in Komplex **L05**. Die Abstandszunahme bei Komplex **L06** war vermutlich der zu kurzen Simulationsdauer geschuldet. Aufgrund des erhöhten Basenabstandes und des verringerten Helixdurchmessers, dehnte sich der Einzelstrangabschnitt von Komplex **L06** zunächst aus und kompensierte dadurch die Abstandsabnahme in Folge der erhöhten Biegewahrscheinlichkeit.

Tabelle 9: Einfluss der Flexibilität auf den Abstand d und den Winkel θ zwischen den Liganden in den bivalenten Komplexen **L05**, **L06** und **L15**. Angegeben sind der Mittelwert sowie die Standardabweichung. (ermittelt durch MD-Simulationen).

Komplex	$d/\text{Å}$	$\theta/^\circ$
L15 	103 ± 3.86	129 ± 3.38
L05 	99 ± 5.46	112 ± 4.80
L06 	110 ± 5.54	59 ± 7.60

Betrachtet man die eingenommenen Winkel zwischen den Liganden, werden ebenfalls Unterschiede sichtbar. Während die Torsionswinkel für die doppelsträngigen Komplexe **L05** und **L15** in der gleichen Größenordnung waren, wurde für den teilweise einzelsträngigen Komplex **L06** ein komplett anderer Wert gemessen (vergleiche **L05** und **L15** mit **L06**, Tabelle 9). Dies und die erhöhte Standardabweichung des Torsionswinkels für Komplex **L06** zeigen, dass der Einzelstrangabschnitt eine höhere Flexibilität als der entsprechende Doppelstrang hatte. Zugleich zeigt die erhöhte Standardabweichung des Torsionswinkels für Komplex **L05**, dass bereits Einzelstrangbrüche innerhalb eines Doppelstrangs die Flexibilität erhöhten (vergleiche **L05** mit **L15**, Tabelle 9).

In einer zweiten Simulation wurde untersucht, inwieweit Einzelstrangbrüche und -abschnitte die Ausbildung einer gebogenen Konformation, die für die bivalente Bindung der Komplexe an ECL nötig war, begünstigten. Da eine Simulation von 30 ns nur zu moderaten Biegungen innerhalb der Komplexe führte, wurde die Simulation in der Form abgeändert, dass auf die Komplexe eine Kraft derart einwirkte, dass diese sich verbogen. Nachdem die Komplexe eine gebogene Konformation eingenommen hatten, in welcher der Abstand zwischen den LacNAc-Liganden dem Abstand der Bindungstaschen in ECL entsprach (siehe Abbildung 47), wurde eine kurze MD-Simulation durchgeführt und dabei die Kraft gemessen, die nötig war, um die Komplexe in diesen potenten Konformationen zu halten. Die gemessene Kraft sollte ein Maß für die Strangflexibilität sein, da sie ebenso als Kraft interpretiert werden kann, die aufgewendet werden muss, damit die Komplexe eine gebogene Konformation einnehmen. Erwartungsgemäß musste die meiste Kraft bei Komplex **L15** aufgewendet werden, d. h. dem Komplex mit dem durch-

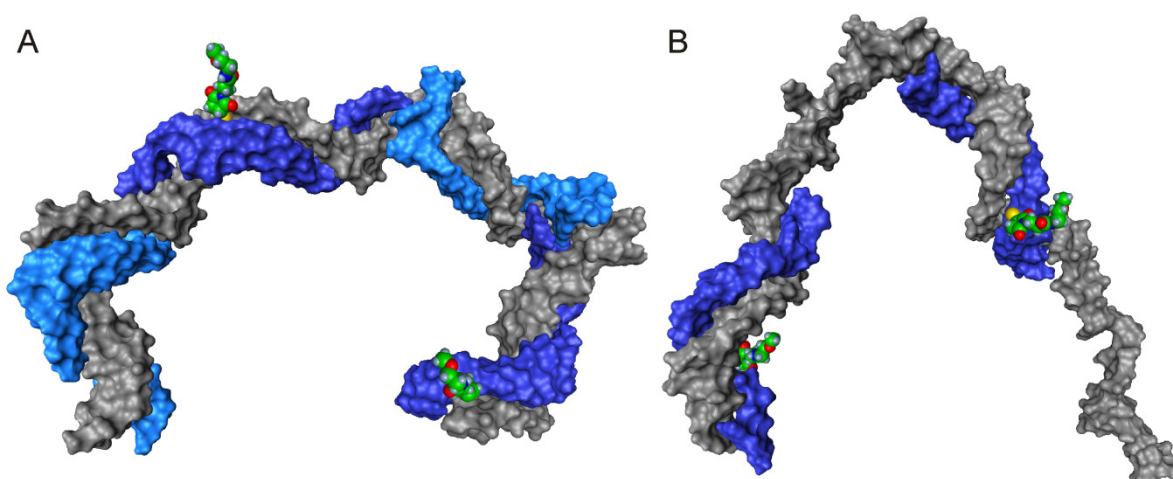


Abbildung 47: In MD-Simulationen wurde auf die bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexe derart eine Kraft ausgeübt, dass diese sich verbogen und eine Konformation einnahmen, die eine bivalente Bindung an ECL ermöglichte. A) Komplex **L05** verbog sich hauptsächlich an den Einzelstrangbrüchen während die Doppelstrangbereiche in einer linearen Konformation verblieben. B) In Komplex **L06** wurde die gebogene Konformation durch einen Knick in dem Einzelstrangbereich realisiert. (Die Bilder wurden mit Amira^[140] erzeugt. schwarz = DNA-Strang, blau = PNA-Stränge, grün = Linker)

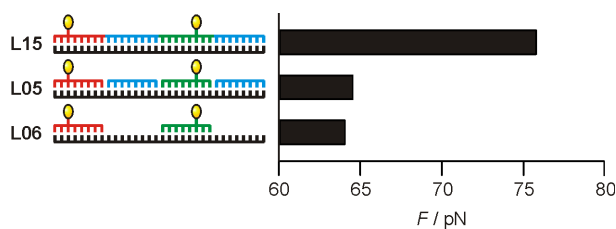


Abbildung 48: Durchschnittliche Kraft, die auf den Strang wirkte, um die bivalenten Komplexe **L05**, **L06** und **L15** in einer gebogenen Konformation zu halten (ermittelt durch MD-Simulationen).

gängigen PNA-Rückgrat (siehe Abbildung 48). Die Einführung von Einzelstrangbrüchen (**L05**) oder -abschnitten (**L06**) erhöhte die Flexibilität der Komplexe, da die gemessene Kraft abnahm. Dieser Effekt war etwas größer bei Einzelstrangabschnitten (Komplex **L06**). Demzufolge sollten gebogene Konformationen, die eine bivalente Bindung an ECL ermöglichen, bei diesen Komplexen wahrscheinlicher sein. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die MD-Simulationen die Ergebnisse aus den SPR-Messungen bestätigten.

4.8.6 Vergleich der Ergebnisse der Bindungsstudien

Für die Wechselwirkung zwischen den LacNAc-PNA•DNA-Komplexen und ECL konnte in dem SPR-basierten Assay eine klare Abhängigkeit der Bindungsstärke von sowohl der Anzahl der Liganden als auch dem Abstand zwischen diesen beobachtet werden. Dabei wurde eine intramolekulare Bindung der bivalenten Komplexe an ein ECL-Molekül nachgewiesen, wenngleich auch eine intermolekulare Bindung beobachtet wurde. Die LacNAc-PNA•DNA-Komplexe konnten als molekulares Lineal zur Vermessung des Abstandes zwischen den Bindungstaschen von ECL eingesetzt werden. Der ermittelte Abstand stimmte gut mit dem aus der Kristallstruktur gemessenen überein.

In dem Fluoreszenzanisotropie-Assay konnten hingegen keine intramolekularen Wechselwirkungen zwischen den LacNAc-PNA•DNA-Komplexen und ECL nachgewiesen werden. Intermolekulare Aggregation trat hingegen auf. Da die gebildeten Aggregate zudem ausfielen, konnte der Fluoreszenzanisotropie-Assay nicht zur Untersuchung der Wechselwirkungen eingesetzt werden. Bei Untersuchung der Wechselwirkung mittels ELLA wurden nur geringfügige Unterschiede zwischen den Komplexen registriert. Eine bivalente Bindung fand nicht statt. Stattdessen banden die bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexe mit nur einen Liganden an ECL. Im Gegensatz zu den Fluoreszenzanisotropie-Messungen kam es auch nicht zu intermolekularer Aggregation zwischen den LacNAc-PNA•DNA-Komplexen und ECL. Der Grund für diesen Unterschied war vermutlich der Tatsache geschuldet, dass die Konzentration an ECL in dem Fluoreszenzanisotropie-Assay 4000 Mal größer war als in dem ELLA (20 μ M gegenüber 5 nM). Die Wahrscheinlichkeit für intermolekulare Wechselwirkungen war bei dieser niedrigen ECL-Konzentration zu gering. Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse der SPR-Messungen gestützt. Auch wenn

dabei ECL immobilisiert war, nahm auch in diesem Fall die Wahrscheinlichkeit für intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexen und zwei ECL-Molekülen mit sinkender ECL-Konzentration ab.

Das eventuelle Vorhandensein einer, bisher nicht dokumentierten, sekundären Bindungstasche sowie der Fakt, dass die Bindungsaffinitäten in Einzelfällen je nach verwendetem kinetischem Modell unterschiedlich waren, erschwerte die Auswertung der SPR-Messungen zur Untersuchung der Bindungsaffinität der LacNAc-PNA•DNA-Komplexe gegenüber RCA₁₂₀. Dennoch konnten, wie bei den SPR-Messungen mit ECL, die bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexe als molekulares Lineal zur Vermessung der räumlichen Anordnung der Bindungstaschen von RCA₁₂₀ eingesetzt werden. Der ermittelte Abstand war in guter Übereinstimmung mit dem aus der Kristallstruktur gemessenen. Im Fall von ConA konnten hingegen keine Bindungsaffinitäten bestimmt werden und folglich keine räumliche Rasterung der Bindungsstellen von ConA durchgeführt werden.

Die Affinitäten der LacNAc-PNA•DNA-Komplexe für ECL und RCA₁₂₀ konnten in dem SPR-basierten Assay zudem durch Variation der Anzahl der präsentierten Liganden moduliert werden. Beim Übergang von mono- zu tetravalenter Präsentation stieg die relative Bindungsaffinität je LacNAc-Ligand für ECL auf das 182-fache und für RCA₁₂₀ auf das 24-fache an.

Neben dem Ligandenabstand und der Ligandenanzahl hatte auch die Flexibilität des Gerüsts, über welches die Liganden präsentiert wurden, einen Einfluss auf die Bindungsaffinität. Bei den Messungen mit ECL und RCA₁₂₀ wiesen Komplexe mit Einzelstrangabschnitten, aufgrund ihrer höheren Flexibilität, stets höhere Affinitäten auf als ihre durchgängig doppelsträngigen Pendants. Diese Beobachtung war in Übereinstimmung mit der räumlichen Anordnung der Bindungstaschen beider Lektine. Demnach waren flexible Komplexe eher in der Lage, eine gebogene Konformation einzunehmen, die für eine intramolekulare, bivalente Bindung an die Lektine nötig war. Durch MD-Simulationen konnte diese These untermauert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dem PNA•DNA-Duplex multivalente Strukturen aufgebaut werden konnten, in denen die Anzahl der Liganden und der Abstand zwischen diesen mit hoher Präzision eingestellt werden konnten. Außerdem konnte die Flexibilität des Gerüsts durch Einführung von Einzelstrangabschnitten moduliert werden. Die multivalenten PNA•DNA-Komplexe konnten als molekulares Lineal mit atomarer Auflösung eingesetzt werden. Allerdings hingen die Einsatzmöglichkeiten wesentlich von dem untersuchten System, d. h. der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung, und dem verwendeten Bindungsassay ab.

Die experimentellen Rahmenbedingungen zwischen ELLA, SPR- und Fluoreszenzanisotropie-Assay unterscheiden sich mitunter stark. So weichen z. B. die Konzentrationsgradienten zwischen den beteiligten Bindungspartnern des heterogenen SPR-Assays stark von denen des homogenen Fluoreszenzanisotropie-Assays ab. Bei Betrachtung von multivalenten Wechselwirkungen beeinflusst dies wiederum den Bindungsvorgang, insbesondere ob und wenn ja, welche multivalenten Wechselwirkungsmechanismen dabei zum Tragen kommen. So könnten bestimmte Mechanismen je nach vorliegender Konzentration bevorzugt gegenüber anderen sein. Vermeintlich hochaffine Bindungspartner könnten bei Verwendung eines anderen Assays nur niedrige Affinitäten aufweisen.^[113-114] Beachtet man jedoch diese Einschränkungen, stellen die multivalenten Kohlenhydrat-PNA•DNA-Komplexe ein leistungsfähiges Werkzeug für die räumliche Rasterung von Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen dar.

Wie bereits in Kapitel 2.4 erläutert, wurden bisherige räumliche Rasterungen von Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen meist unter Verwendung von flexiblen Gerüsten durchgeführt.^[57-62] Die hohe Flexibilität stellt jedoch auch den größten Nachteil dieser Gerüste dar. Im Gegensatz zum PNA•DNA-Duplex können die Strukturen nicht sehr präzise vorhergesagt werden und folglich die räumliche Anordnung der präsentierten Liganden nicht genau ermittelt werden. Die Gerüste können zwar in ihrer Flexibilität variiert werden, doch ist dies meist mit einem hohen synthetischen Aufwand verbunden.^[114] Im Gegensatz dazu kann die Flexibilität des PNA•DNA-Duplexes mit einfachen Mitteln, d. h. nur durch die Einführung von Einzelstrangbrüchen und/oder Einzelstrangabschnitten unterschiedlicher Länge, fein moduliert werden. Prinzipiell ist ein fließender Übergang von einem starren Stab zu einer flexiblen Schnur möglich.

Durch die Verwendung von automatisiert hergestellten Peptiden als Gerüst konnten mit geringem Aufwand riesige Glykopeptid-Bibliotheken erzeugt werden.^[63-66, 138] Die Diversität der Peptide in Bezug auf ihre räumliche Präsentation der Liganden war enorm. Obwohl dadurch mit relativ geringem Aufwand hoch potente Binder identifiziert werden können, ist der Einsatz dieser Bibliotheken als molekulares Lineal begrenzt, da die Strukturen der einzelnen Vertreter oft nicht vorhersagbar sind und erst durch z. B. NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallographie aufgeklärt werden müssen. Hingegen ist die Struktur des PNA•DNA-Duplex mit atomarer Auflösung definiert.

4.9 Untersuchungen zur Bindungsaffinität von L-Selektin

Das in Kapitel 4.8 entwickelte Werkzeug auf PNA•DNA-Basis wurde zur räumlichen Rasterung der Wechselwirkung zwischen Selektinen und seinen Liganden verwendet. Neben dem natürlichen Tetrasaccharid Sialyl-Lewis-X wurde auch ein artifiziell generiertes DNA-Aptamer multivalent präsentiert und der Einfluss 1) der Ligandenanzahl, 2) des Abstands zwischen den Ligan-

den und 3) der Flexibilität des Gerüsts, das die Liganden verband, untersucht. Da sLe^x die höchste Affinität für L-Selektin hat, wurde sich im Rahmen dieser Arbeit auf dieses Selektin beschränkt. Außerdem ermöglichte dies einen direkten Vergleich mit dem L-Selektin-bindenden Aptamer. Es wurden ein kompetitiver SPR-Assay und ein zellbasierter Flusskammer-Assay verwendet.

4.9.1 Kompetitiver SPR-Assay

4.9.1.1 Prinzip des kompetitiven SPR-Assays

Der kompetitive SPR-Assay wurde von Enders *et al.*^[141] entwickelt und in Kooperation mit Dr. Stefanie Wedepohl und Dr. Jens Dornedde (Charité – Universitätsmedizin Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die theoretischen Grundlagen von SPR wurden bereits in Kapitel 4.8.4.1 erläutert. Im Gegensatz zu dem dort beschriebenen SPR-basierten Assay wurde jedoch nicht die Bindung der sLe^x- bzw. Aptamer-PNA•DNA-Komplexe an immobilisiertes L-Selektin, sondern die Inhibierung der Wechselwirkung zwischen L-Selektin und einem Referenzliganden untersucht (siehe Abbildung 49). Statt dem Lektin, also L-Selektin, wurde ein biotinyliertes Polyacrylamid-Polymer, das mit 20 mol% sLe^x und 5 mol% Sulfotyrosin funktionalisiert war, auf einem mit Streptavidin beschichteten Sensor-Chip immobilisiert. Anschließend wurden mit Protein A-beschichtete Gold-Nanopartikel, die zuvor mit Immunglobulin G-markierten L-Selektin inkubiert wurden, über die sLe^x/sTyr-Oberfläche geleitet und assoziierten an diese. Das System ahmte die Assoziation von Leukozyten (L-Selektin-Nanopartikel) aus dem Blutstrom an PSGL-1-Liganden (sLe^x/sTyr-funktionalisiertes Polymer) auf dem Endothel (Sensor-Chip-Oberfläche) infolge einer Entzündung künstlich nach (siehe Kapitel 2.3). Bei vorheriger Inkubation der L-Selektin-Nanopartikel mit sLe^x- bzw. Aptamer-PNA•DNA-Komplex, assoziierte in der Folge weniger an die sLe^x/sTyr-Oberfläche, da L-Selektin-Moleküle, die bereits sLe^x- bzw. Aptamer-PNA•DNA-Komplex gebunden hatten, nicht mehr mit der sLe^x/sTyr-Oberfläche wechselwirkten. Das Signal nahm mit steigender Konzentration an Inhibitor ab. Ein Vergleich der sLe^x- bzw. Aptamer-PNA•DNA-

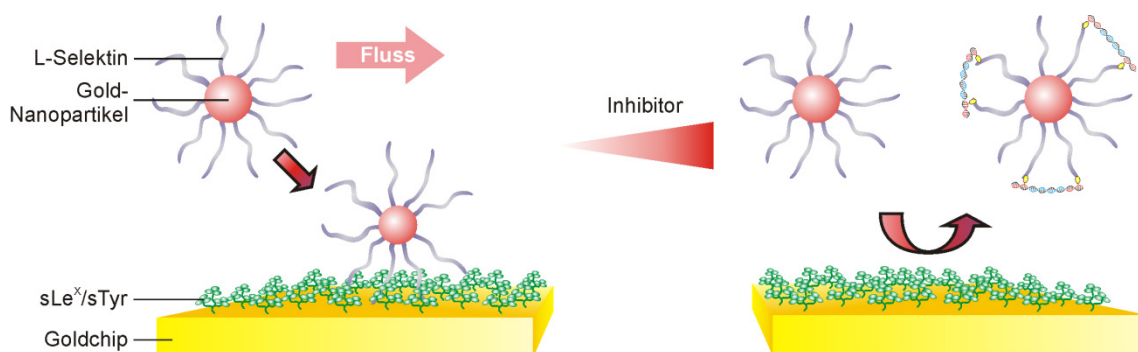


Abbildung 49: Prinzip des kompetitiven SPR-Assays. In einer Flusskammer wird die Bindung von L-Selektin-beschichteten Gold-Nanopartikeln an immobilisiertes sLe^x und Sulfotyrosin durch Zugabe steigender Konzentrationen an sLe^x- bzw. Aptamer-PNA•DNA-Komplex inhibiert.

Komplexe war anhand ihrer IC_{50} -Werte, d. h. den Konzentrationen, bei denen 50 % Inhibierung auftrat, möglich.

4.9.1.2 Inhibierung der Selektin-Bindung durch multivalente Aptamer-PNA•DNA-Komplexe

Im Rahmen von SELEX (Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung)-Experimenten identifizierten Hicke *et al.* ein DNA-Aptamer, das mit hoher Affinität ($K_D = 1.8$ nM) und Selektivität L-Selektin bindet.^[142] Wenngleich eine Kristallstruktur von L-Selektin mit dem gebundenen Aptamer bisher nicht gelöst wurde, gibt es Hinweise darauf, dass das Aptamer nahe oder in der Bindungstasche der Lektin-Domäne bindet. So wird die Wechselwirkung durch den L-Selektin-Antikörper DREG-56^[143] gehemmt und ist, ebenso wie die von sLe^x, vom Vorhandensein zweiwertiger Kationen abhängig. Allerdings sei angemerkt, dass die Faltung von Aptameren ebenfalls kationenabhängig sein kann und folglich der Verlust der Bindungsaffinität in Abwesenheit zweiwertiger Kationen eventuell das Resultat einer Fehlfaltung des Aptamers war. Die Sequenz des hier verwendeten Aptamers **89** ist von der ursprünglichen Sequenz abgeleitet und wurde durch systematische Verkürzung als der Teil identifiziert, der an der Bindung beteiligt ist.^[144] Das molekulare Lineal aus Kapitel 4.8 wurde verwendet, um das Aptamer mit hoher Präzision multivalent zu präsentieren.

In einem kompetitiven SPR-Assay (siehe Kapitel 4.9.1.1) wurde die inhibierende Wirkung (IC_{50} -Werte) der multivalenten Aptamer-PNA•DNA-Komplexe **A01** – **A14** auf die Bindung von Selektin-Nanopartikeln an immobilisiertes sLe^x/sTyr untersucht. Während das monovalente Aptamer **89** einen IC_{50} von 21.1 nM aufwies, hatte der, ebenfalls monovalente, Aptamer-PNA•DNA-Komplex **A11** einen IC_{50} von 12.8 nM (siehe Tabelle 10 und Abbildung 50). Eine Erklärung für diesen Befund liefert das Phänomen der sterischen Stabilisierung. Demnach führte die Anbringung des voluminösen PNA•DNA-Gerüsts an das Aptamer dazu, dass der L-Selektin-Nanopartikel, sobald der Aptamer-PNA•DNA-Komplex **A11** an diesen gebunden hatte, effektiver vor einer Wechsel-

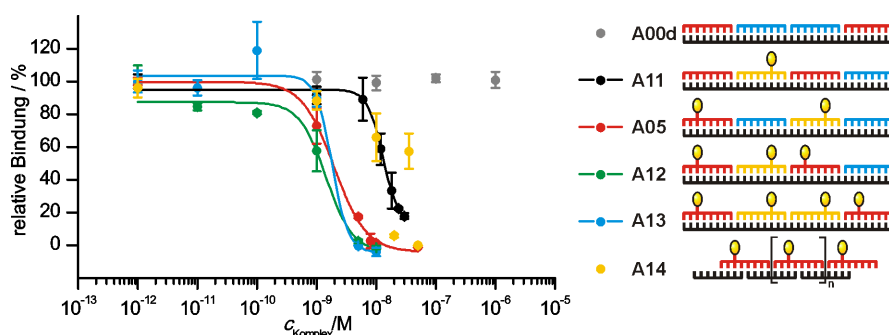








Abbildung 50: Dosis-Wirkungs-Kurven für die Inhibierung der Wechselwirkung zwischen L-Selektin-Gold-Nanopartikeln und oberflächenimmobilisiertem sLe^x/sTyr durch den PNA•DNA-Duplex **A00d** sowie die Aptamer-PNA•DNA-Komplexe **A05** und **A11** – **A14**. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. (Bedingungen: 18 min Inkubation bei Raumtemperatur, Flussrate: 20 μ L·min⁻¹, 105 s Assoziation, 180 s Dissoziation, Puffer: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, pH 7.4)

Tabelle 10: Konzentrationen für die 50 %ige Inhibierung (IC_{50}) der Wechselwirkung zwischen L-Selektin-Gold-Nanopartikeln und oberflächenimmobilisiertem sLe^x/sTyr durch das Aptamer **93** allein sowie die Aptamer-PNA•DNA-Komplexe **A05** und **A11** – **A14**. Neben den IC_{50} -Werten ist der Standardfehler für die Berechnung dieser Werte angegeben. (Bedingungen: 18 min Inkubation bei Raumtemperatur, Flussrate: 20 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 105 s Assoziation, 180 s Dissoziation, Puffer: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , pH 7.4)

	Substrat	IC_{50}/nM	Relative Bindungsstärke pro Aptamer
A00d		[a]	[a]
	Aptamer 89	21.1 ± 12.0	0.6
A11		12.8 ± 1.3	1
A05		2.0 ± 0.2	3.2
A12		1.4 ± 0.4	3.0
A13		1.8 ± 0.6	1.8
A14		[b]	[b]

[a] keine Inhibierung; [b] Bestimmung des IC_{50} nicht möglich.

wirkung mit der sLe^x/sTyr-beschichteten Oberfläche abgeschirmt war. Bekräftigt wird diese These durch die Tatsache, dass der unmodifizierte PNA•DNA-Komplex **A00d**, der die gleiche Sequenz hatte, keine inhibierende Wirkung hatte (siehe Abbildung 50) und folglich nicht mit dem L-Selektin-Nanopartikel wechselwirkte.

Durch Anbringung eines zweiten Aptamer-Liganden an den PNA•DNA-Duplex stieg die Affinität stark an. Für den bivalenten Komplex mit der höchsten Affinität (**A05**) betrug die relative Bindungsstärke je Aptamer-Ligand das 3.2-fache des monovalenten Komplexes **A11**. Die tri- und tetravalenten Komplexe **A12** und **A13** hatten in etwa die gleichen Affinitäten wie der bivalente Komplex **A05**. Auf valenzkorrigierter Basis bedeutet dies, dass die relative Bindungsstärke pro Ligand im trivalenten Komplex **A12** das 3.0-fache und im tetravalenten Komplex **A13** das 1.8-fache des monovalenten Komplexes **A11** war. Die größte Steigerung trat demnach beim Übergang von mono- zu bivalenter Präsentation auf. Bei weiterer Erhöhung der Valenz auf tri- und tetravalente Präsentation nahm die relative Bindungsstärke je Ligand wieder ab. Der IC_{50} des polyvalenten Aptamer-PNA•DNA-Komplexes **A14** konnte aufgrund stark schwankender Werte (siehe Abbildung 50) nicht bestimmt werden.

Bei den Bindungsstudien zur Affinität der LacNAc-PNA•DNA-Komplexe gegenüber ECL (Kapitel 4.8.4.2) und RCA₁₂₀ (Kapitel 4.8.4.3) erhöhte sich stets die relative Bindungsstärke je Ligand bei Erhöhung der Valenz. Im Fall der Aptamer-PNA•DNA-Komplexe erniedrigte sie sich jedoch (siehe Tabelle 10). Da das Aptamer wesentlich voluminöser war als *N*-Acetyllactosamin, könnte es bei drei- und vor allem vierfacher Anbringung an den PNA•DNA-Duplex zu sterischer Abstoßung zwischen den Aptamer-Liganden gekommen sein. Als Konsequenz wären einzelne Ligan-

den oder auch nur Bereiche, die für die Bindung nötig waren, blockiert gewesen und hätten dadurch nicht mehr an L-Selektin binden können. Des Weiteren hätte die räumliche Nähe der Aptamer-Liganden zueinander dazu führen können, dass es bei der Hybridisierung der Aptamer-PNA•DNA-Komplexe zu Fehlfaltungen einzelner Aptamer-Liganden kam, z. B. indem das 5'-Ende eines Aptamers nicht mit dem 3'-Ende des eigenen Strangs, sondern dem eines benachbarten Aptamers hybridisierte. Die Bindungsaffinität dieser fehlgefalteten Aptamer-Liganden wäre die Folge gewesen. In beiden Fällen wären multivalente Wechselwirkungsmechanismen, wie z. B. statistische Rückbindung, nicht zum Tragen gekommen und hätten folglich nicht zu einer Affinitätssteigerung geführt.

Sofern der Beitrag der statistischen Rückbindung zur Gesamtaffinität sehr gering war, ist zudem eine andere Begründung plausibel. Laut dieser waren, unabhängig von der Anzahl der präsentierten Liganden, maximal zwei Aptamer-Liganden in der Lage, simultan an die L-Selektin-Nanopartikel zu binden. Der Grund dafür ergibt sich aus der Struktur der Aptamer-PNA•DNA-Komplexe. Demnach müssten für eine trivalente oder tetravalente Bindung drei bzw. vier L-Selektin-Moleküle entlang einer Geraden im Raum angeordnet sein. Die Wahrscheinlichkeit dafür ist jedoch sehr gering.

Anschließend wurde der Einfluss des Abstandes zwischen zwei bivalent präsentierten Aptamer-Liganden auf die Bindungsaffinität gegenüber den L-Selektin-Nanopartikeln untersucht. Sowohl bei den durchgängig doppelsträngigen (durchgezogene Linie in Abbildung 51) als auch den teilweise einzelsträngigen Komplexen (gestrichelte Linie in Abbildung 51) nahm die Affinität mit zunehmendem Abstand zwischen den Aptamer-Liganden zu. Lediglich der bivalente Aptamer-PNA•DNA-Komplex **A07** und sein flexibles Pendant **A08** wichen von diesem Trend ab. Bis auf **A07** und **A08** hatten zudem sämtliche der bivalenten Komplexe eine höhere Affinität als der

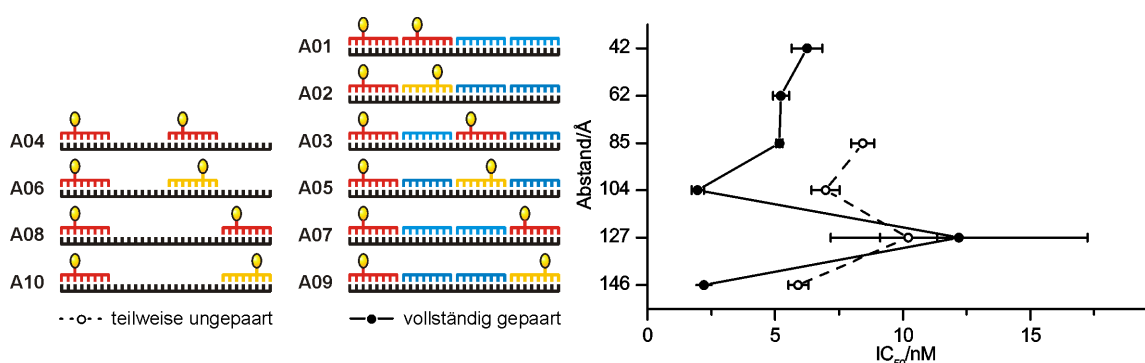


Abbildung 51: Einfluss des Abstands auf die Konzentrationen für die 50 %ige Inhibierung (IC₅₀) der Wechselwirkung zwischen L-Selektin-Nanopartikeln und immobilisiertem sLe^x/sTyr durch das Aptamer **93** und die bivalenten Aptamer-PNA•DNA-Komplexe **A01** – **A10**. Neben den IC₅₀-Werten ist der Standardfehler für die Berechnung dieser Werte angegeben. (Bedingungen: 18 min Inkubation bei Raumtemperatur, Flussrate: 20 µL·min⁻¹, 105 s Assoziation, 180 s Dissoziation, Puffer: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, pH 7.4)

monovalente Komplex **A11**. Demzufolge waren beide der präsentierten Aptamer-Liganden in der Lage an L-Selektin zu binden. Eine Verminderung der Bindungsaffinität der präsentierten Aptamer-Liganden, z. B. durch sterische Abstoßung infolge zu dichter Präsentation, konnte demnach ausgeschlossen werden. Zunächst werden nur die bivalenten Komplexe **A01** – **A06** sowie **A09** und **A10** betrachtet.

Bei den durchgängig doppelsträngigen Komplexen **A01**, **A02**, **A03**, **A05** und **A09** (durchgezogene Linie in Abbildung 51) erhöhte sich die Affinität für Abstände von 42 – 85 Å zunächst nur schwach, stieg dann aber für Abstände von 104 und 146 Å etwas stärker an. Im Detail entsprach der beobachtete Affinitätsgewinn für Abstände von 42 – 85 Å ($IC_{50} = 5.2 - 6.3$ nM) dem, was durch Verdopplung der Ligandenanzahl zu erwarten wäre, d. h. auf valenzkorrigierter Basis war annähernd kein Affinitätsgewinn gegenüber dem monovalenten Komplex **A11** ($IC_{50} = 12.8$ nM) zu verzeichnen. Für Abstände von 104 und 146 Å erhöhte sich die relative Bindungsstärke je Aptamer ungefähr auf das Dreifache ($IC_{50} = 2.0 - 2.2$ nM). Da die genaue Anzahl der L-Selektin-Moleküle auf dem Gold-Nanopartikel nicht bekannt war, konnten keine Aussagen zur Valenz der L-Selektin-Nanopartikel getroffen werden und dementsprechend auch nicht der Beitrag statistischer Effekte^[80] zur Affinitätssteigerung abgeschätzt werden. Dennoch deutet die Affinitätszunahme beim Übergang zu Abständen größer 100 Å auf einen Wechsel des Bindungsmechanismus von monovalenter zu bivalenter Bindung hin. Die Ausbildung einer intermolekularen Bindung an zwei L-Selektin-Nanopartikel stellt eine Möglichkeit bivalenter Bindung dar. Allerdings konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass diese Wechselwirkung vornehmlich bei hohen Konzentrationen der beteiligten Bindungspartner auftritt (siehe Kapitel 4.8.3.2 und 4.8.4.2). Da die Konzentration in diesem Fall sehr niedrig war, war diese Möglichkeit zwar nicht ausgeschlossen, aber unwahrscheinlich. Stattdessen kam es vermutlich zu einer intramolekularen Bindung an zwei benachbarte L-Selektin-Moleküle auf einem Gold-Nanopartikel.

Die Affinität der bivalenten Komplexe mit Einzelstrangabschnitten (**A04**, **A06** und **A10**, gestrichelte Linie in Abbildung 51) nahm ebenfalls mit größer werdendem Abstand zwischen den Aptamer-Liganden zu. Die Zunahme war allerdings nicht so groß wie bei den durchgängig doppelsträngigen Komplexen. Grund dafür war, dass durch die höhere Flexibilität die Abstände zwischen den Liganden variabler waren und dadurch der Einfluss des Abstands auf das Bindungsverhalten geringer war. Bemerkenswert ist allerdings, dass durch die Einführung von Einzelstrangabschnitten in die Komplexe, deren Affinität für L-Selektin abnahm (vergleiche **A03**, **A05** und **A09** mit **A04**, **A06** und **A10**). Bei den Untersuchungen zum Bindungsverhalten von ECL (Kapitel 4.8.4.2) und RCA₁₂₀ (Kapitel 4.8.4.3) führte eine größere Flexibilität der LacNAc-PNA•DNA-Komplexe, stets zu höherer Affinität. Der Bindungsmechanismus an L-Selektin war demnach ein anderer.

In Kapitel 2.3.2 wurde bereits auf die Besonderheiten der Bindung von L-Selektin an seine natürlichen Liganden eingegangen, d. h. die Affinitätserhöhung der Bindungstasche von L-Selektin durch Krafteinwirkung („catch“-Bindung). Unter der Voraussetzung, dass das Aptamer ebenfalls eine „catch“-Bindung mit L-Selektin ausbildet, könnte ein bivalentes Substrat von einem starren Gerüst profitieren. Anhand der beiden bivalenten Aptamer-PNA•DNA-Komplexe **A05** und **A06** soll dieser Sachverhalt verdeutlicht werden. Während das erste Bindungsereignis in beiden Fällen identisch ist, kann das zweite je nach Komplex unterschiedlich ablaufen.

Zunächst wird der starre Komplex **A05** betrachtet. Nachdem ein Ligand an ein L-Selektin-Molekül gebunden hat, kann der zweite, noch ungebundene Ligand an ein benachbartes L-Selektin-Molekül binden. Für den Fall, dass der Abstand zwischen den Bindungstaschen der beiden L-Selektin-Moleküle nicht mit dem Abstand der Aptamer-Liganden in **A05** übereinstimmt, müssen entweder die L-Selektin-Moleküle oder der PNA•DNA-Duplex seine Konformation ändern, um die Bindung zu ermöglichen. Der PNA•DNA-Duplex von **A05** ist allerdings so starr, dass eine Konformationsänderung mit einem erheblichen Energieaufwand verbunden wäre. Dieser wäre größer, als durch das zweite Bindungsereignis wieder gewonnen würde. Eine Konformationsänderung in L-Selektin würde ebenfalls Energie erfordern, doch würde diese nicht nur das zweite Bindungsereignis ermöglichen, sondern zusätzlich auch die Affinität der Bindungstasche erhöhen. Das Zusammenspiel beider Effekte würde den Energieaufwand für die Änderung der Konformation in L-Selektin aufwiegen. Im Gegensatz dazu tritt die Konformationsänderung in L-Selektin bei dem flexiblen Komplex **A06** nicht auf, da dessen Gerüst flexibel genug ist, um den Abstand zwischen den Liganden auch ohne großen Energieaufwand einzustellen. Beim Zug an dem Lektin würde nicht L-Selektin, sondern der Einzelstrangabschnitt des PNA•DNA-Komplexes nachgeben. Die Bindungstaschen würden nicht ihre Konformation ändern und die Gesamtaffinität würde geringer sein. Obwohl bei dieser Argumentation eine „catch“-Bindung nach dem allosterischen Modell impliziert wird, treffen diese Aussagen auch zu, falls der Mechanismus der „catch“-Bindung dem des Rückbindungs-Modells entspricht (siehe Kapitel 2.3.2). Grund dafür ist, dass der Energieaufwand für eine Konformationsänderung auch mit einer Kraft gleichgesetzt werden kann, die wirken muss, um diese zu induzieren (vergleiche mit den MD-Simulationen aus Kapitel 4.8.5).

Wie bereits erwähnt, wich das Bindungsverhalten der Komplexe **A07** und **A08** von denen der anderen bivalenten Aptamer-PNA•DNA-Komplexe ab. Tatsächlich waren die IC_{50} -Werte die größten aller bivalenten Aptamer-PNA•DNA-Komplexe. Zudem gab es nahezu keinen Unterschied in der Affinität zwischen dem starren Komplex **A07** und dem flexiblen Komplex **A08**. Im Gegensatz zu den anderen bivalenten Komplexen (**A01** – **A06**, **A09** und **A10**) entsprachen die IC_{50} -Werte von 10.2 und 12.2 nM nahezu denen des monovalenten Komplexes **A11** ($IC_{50} = 12.8$ nM). Weil

der unmodifizierte PNA•DNA-Komplex **A00d** mit der gleichen Sequenz keine inhibierende Wirkung zeigte, konnte eine sequenzspezifische Wechselwirkung des PNA•DNA-Gerüsts ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 50). Allerdings konnte bei der Untersuchung der Stabilität der Aptamer-PNA•DNA-Komplexe mittels Denaturierungsexperimenten die Integrität von Komplex **A07** nicht eindeutig bestätigt werden (siehe Kapitel 4.7), da eventuell sequenzspezifische Wechselwirkungen der Aptamer-Liganden mit dem PNA•DNA-Gerüst zu einer Destabilisierung von Komplex **A07** führten. Diese Destabilisierung könnte eine mögliche Ursache für die verringerte Bindungsaffinität gegenüber den L-Selektin-Nanopartikeln gewesen sein.

4.9.1.3 Inhibierung der Selektin-Bindung durch multivalente sLe^x-PNA•DNA-Komplexe

Das in Kapitel 4.8 entwickelte molekulare Lineal wurde ebenfalls verwendet, um den Einfluss der räumlichen Präsentation von Sialyl-Lewis-X auf das Bindungsverhalten gegenüber L-Selektin zu studieren. Dazu wurden die multivalenten sLe^x-PNA•DNA-Komplexe, analog den Aptamer-PNA•DNA-Komplexen (siehe Kapitel 4.9.1.2), auf ihre Fähigkeit zur Inhibierung der Wechselwirkung zwischen L-Selektin-beschichteten Gold-Nanopartikeln und oberflächenimmobilisiertem sLe^x/sTyr untersucht. Im Vergleich zu den Messungen mit den Aptamer-PNA•DNA-Komplexen wurde der kompetitive SPR-Assay jedoch derart abgewandelt, dass nur die halbe Menge an L-Selektin-Nanopartikel zugegeben wurde. Dadurch sollte der relative Überschuss an sLe^x-PNA•DNA-Komplex gegenüber L-Selektin-Nanopartikel vergrößert werden und folglich auch die inhibierende Wirkung erhöht werden. Doch auch unter diesen Bedingungen war die Affinität der Komplexe so gering, dass keiner der sLe^x-PNA•DNA-Komplexe, innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs, die Wechselwirkung vollständig inhibierte (siehe Abbildung 52). Da eine Bestimmung der IC₅₀-Werte demnach nicht möglich war, wurde das relative Bindungssignal,

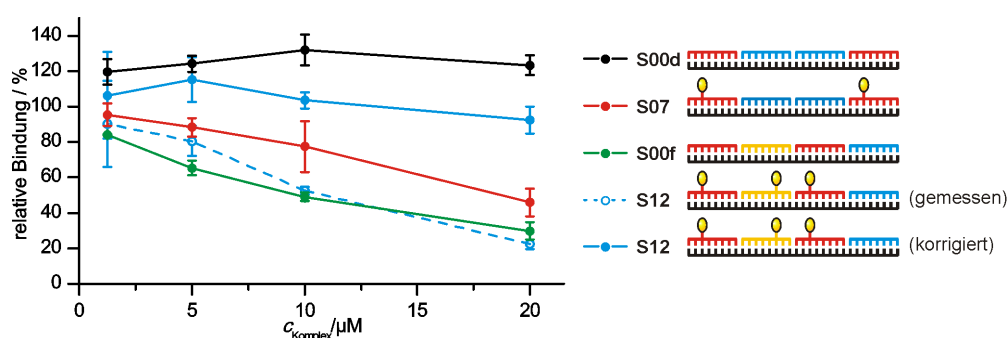






Abbildung 52: Inhibierung der Wechselwirkung zwischen L-Selektin-Gold-Nanopartikeln und oberflächenimmobilisiertem sLe^x/sTyr durch die unmodifizierten PNA•DNA-Komplexe **S00d** und **S00f** sowie die sLe^x-PNA•DNA-Komplexe **S07** und **S12**. Die Inhibierung von Komplex **S12** (gestrichelte blaue Linie) kam hauptsächlich durch die Wechselwirkung des PNA•DNA-Gerüsts **S00f** mit L-Selektin zustande. Um den Beitrag der sLe^x-Liganden an der Bindung zu erhalten (durchgezogene blaue Linie), wurde das Signal von **S00f** von dem Signal von **S12** abgezogen. Angegeben sind der Mittelwert sowie die Standardabweichung. (Bedingungen: 18 min Inkubation bei Raumtemperatur, Flussrate: 20 μL·min⁻¹, 105 s Assoziation, 180 s Dissoziation, Puffer: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, pH 7.4)

das bei der höchsten InhibitorKonzentration (20 μM) gemessen wurde, zum Vergleich der Bindungsaffinitäten der Komplexe herangezogen. Je niedriger das Signal war, desto höher war die Affinität der Komplexe für die L-Selektin-Nanopartikel.

Zu Beginn wurde der Einfluss des PNA•DNA-Gerüsts auf das Bindungsverhalten untersucht. Überraschenderweise wies der unmodifizierte PNA•DNA-Komplex **S00f** eine sehr große inhibierende Wirkung (30 % relative Bindung bei 20 μM) auf (grüne Linie in Abbildung 52). Da keiner der anderen unmodifizierten PNA•DNA-Komplexe **S00** – **S00f** ein derartiges Verhalten zeigte, handelte es sich um ein sequenzspezifisches Phänomen, d. h. der PNA•DNA-Komplex **S00f** besaß, ähnlich dem Aptamer aus Kapitel 4.9.1.2, aufgrund seiner Sequenz Strukturmerkmale, die zu einer Wechselwirkung mit L-Selektin führten. Tatsächlich überstieg der Beitrag des PNA•DNA-Gerüsts **S00f** den Beitrag der Sialyl-Lewis-X-Liganden auf die Gesamtaffinität für L-Selektin deutlich. Bekräftigt wird dies durch die Tatsache, dass der tetravalente Komplex **S13** mit deutlich geringerer Affinität band (siehe Tabelle 11). Um den Beitrag der sLe^x-Liganden auf die Affinität zu erhalten und eine Vergleichbarkeit der sLe^x-PNA•DNA-Komplexe untereinander zu gewährleisten, wurde im Fall des trivalenten sLe^x-PNA•DNA-Komplexes **S12** das Bindungssignal des unmodifizierten PNA•DNA-Komplexes **S00f** von diesem abgezogen (siehe Abbildung 52). Da es sich um ein sequenzspezifisches Phänomen handelte, mussten die Bindungssignale der anderen sLe^x-PNA•DNA-Komplexe nicht angeglichen werden. Auf die Bindungsaffinitäten der Aptamer-PNA•DNA-Komplexe (Kapitel 4.9.1.2), insbesondere **A12**, hatte dieser Befund ebenfalls keine Auswirkungen, da die inhibierende Wirkung des PNA•DNA-Duplexes **S00f** (bzw. **A00f**) erst bei sehr hohen Konzentrationen zum Tragen kam, d. h. im nanomolaren Konzentrationsbereich keine Inhibierung auftrat.

Anschließend wurde der Einfluss der Valenz auf das Bindungsverhalten untersucht (siehe Tabelle 11). Während für den monovalenten Komplex **S01** bei einer Konzentration von 20 μM keine Inhibierung beobachtet wurde, inhibierten die bivalenten Komplexe die Wechselwirkung teilweise. Tatsächlich konnten die L-Selektin-Nanopartikel bei Zugabe des bivalenten sLe^x-PNA•DNA-Komplexes **S07** sehr gut von der sLe^x/sTyr-Oberfläche verdrängt werden (46 % relative Bindung bei 20 μM , siehe Abbildung 52). Der tri- und tetravalente Komplex **S12** bzw. **S13** zeigte hingegen wieder eine geringere Inhibierung. Eine plausible Erklärung, weshalb nur die bivalenten Komplexe zu einer Inhibierung bei 20 μM führten, gab es jedoch nicht. Sterische Wechselwirkungen zwischen den Liganden kamen, aufgrund der geringen Größe von Sialyl-Lewis-X, als Grund vermutlich nicht in Betracht.

Tabelle 11: Bindungsparameter für die Inhibierung der Wechselwirkung zwischen L-Selektin-Gold-Nanopartikeln und oberflächenimmobilisiertem sLe^x/sTyr durch die mono-, bi-, tri- und tetravalenten sLe^x-PNA•DNA-Komplexe **S07** und **S11** – **S13**. Angegeben sind der Mittelwert sowie die Standardabweichung aus drei Experimenten. (Bedingungen: 18 min Inkubation bei Raumtemperatur, Flussrate: 20 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 105 s Assoziation, 180 s Dissoziation, Puffer: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, pH 7.4)

Komplex	Relative Bindung (bei 20 μM)/%
S11 	99.0 \pm 2.8
S07 	45.8 \pm 7.7
S12 	92.6 \pm 7.6 ^[a]
S13 	91.5 \pm 5.6

[a] Für die Bestimmung der relativen Bindung wurde das Signal des unmodifizierten PNA•DNA-Duplexes **S00f** von dem Signal des trivalenten PNA•DNA-Komplexes **S12** abgezogen.

Der Einfluss des Abstands zwischen zwei bivalent präsentierten sLe^x-Liganden auf das Bindungsverhalten wurde ebenfalls untersucht. In den durchgängig gepaarten Komplexen **S01**, **S02**, **S03**, **S05**, **S07** und **S09** wurde der Abstand schrittweise von 42 auf 146 Å erhöht (siehe Abbildung 53, durchgezogene Kurve). Dabei blieb die Affinität für Abstände bis 104 Å (**S01**, **S02**, **S03**, **S05**) nahezu konstant, stieg für einen Abstand von 127 Å (**S07**) bedeutend an und nahm für 146 Å (**S09**) wieder so stark ab, dass nahezu keine Inhibierung auftrat. Gemäß dieser Abstandsabhängigkeit banden die beiden sLe^x-Liganden bevorzugt dann bivalent, wenn sie 127 Å voneinander separiert waren. Analog der Argumentation für das Bindungsverhalten der bivalenten Aptamer-PNA•DNA-Komplexe (siehe Kapitel 4.9.1.2) handelte es sich vermutlich um eine intramolekulare Bindung an zwei benachbarte L-Selektin-Moleküle auf einem Gold-Nanopartikel. Komplexe mit kürzeren oder längeren Abständen als 127 Å wiesen eine geringere Affinität auf, da sie die beiden sLe^x-Liganden in Abständen präsentierten, die für eine bivalente Bindung ungünstig waren. Diese Komplexe waren z. B. nur bei Einnahme einer energetisch ungünstigen Konformation in der Lage, bivalent an die multivalenten L-Selektin-Nanopartikel zu binden.

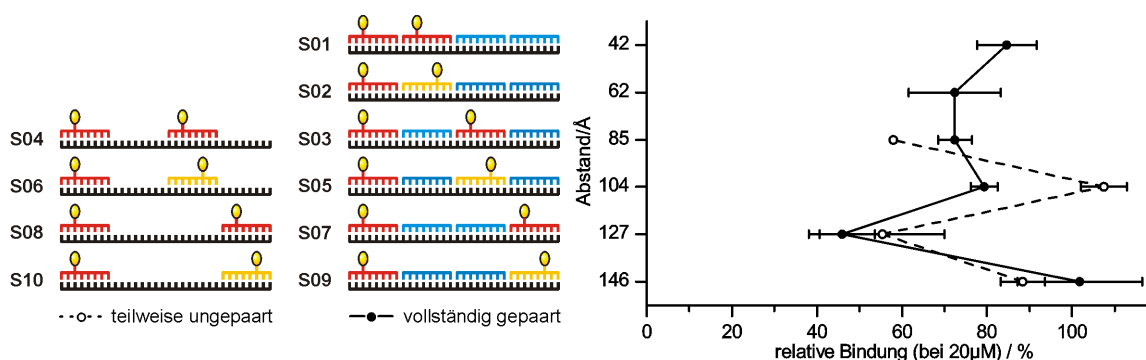


Abbildung 53: Einfluss des Abstands auf die Inhibierung der Wechselwirkung zwischen L-Selektin-Gold-Nanopartikeln und oberflächenimmobilisiertem sLe^x/sTyr durch die sLe^x-PNA•DNA-Komplexe **S01** – **S10**. Angegeben sind der Mittelwert sowie die Standardabweichung aus drei Experimenten. (Bedingungen: 18 min Inkubation bei Raumtemperatur, Flussrate: 20 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 105 s Assoziation, 180 s Dissoziation, Puffer: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, pH 7.4)

Die Einführung von Einzelstrangabschnitten in die bivalenten sLe^x-Komplexe führte zu keiner eindeutigen Änderung der Bindungsaffinität (siehe Abbildung 53, gestrichelte Linie). Interessanterweise nahm die Affinität, bei Verlängerung des Abstandes von 85 auf 146 Å, im Wechsel zu- und wieder ab. Während die Komplexe **S04** und **S08** die Wechselwirkung stark inhibierten, zeigten die Komplexe **S06** und **S10** nahezu keine inhibierende Wirkung. Neben dem Abstand zwischen den präsentierten sLe^x-Liganden unterschieden sich die Komplexe hauptsächlich darin, dass in den Komplexen **S06** und **S10** ein sLe^x-PNA-Konjugat **87** durch **88** ersetzt war. Ein Grund für die hohe inhibierende Wirkung von Komplex **S04** bzw. **S08** könnte demnach gewesen sein, dass das sLe^x-PNA-Konjugat **88**, infolge sequenzspezifischer Wechselwirkungen des PNA•DNA-Gerüsts, eine höhere Affinität für L-Selektin aufwies als **87**. Da andererseits die unmodifizierten PNA•DNA-Duplexe **S00b** und **S00d**, die sequenzidentisch zu **S04** und **S08** waren, keine Inhibierung hervorriefen, musste die Wechselwirkung des PNA•DNA-Gerüsts mit L-Selektin jedoch sehr schwach gewesen sein. Eine Erklärung, wie diese schwache Wechselwirkung dennoch zu einer Affinitätssteigerung geführt haben könnte, liefert das Phänomen der Bindungsverstärkung durch Multivalenz. Demzufolge könnte die Bindung eines einzelnen sLe^x-Liganden an L-Selektin durch das Zusammenspiel mit einer weiteren Wechselwirkung, in diesem Fall der des PNA•DNA-Gerüsts, via multivalenter Wechselwirkungsmechanismen verstärkt worden sein. Dennoch, gegen die These, dass das sLe^x-PNA-Konjugat **87** eine höhere Affinität für die L-Selektin-Nanopartikel aufwies als **88**, spricht, dass bei den durchgängig gepaarten Komplexen **S01**, **S02**, **S03**, **S05**, **S07** und **S09** kein eindeutiger Wechsel zwischen starker und schwacher Inhibition auftrat.

4.9.2 Zellbasierter Flusskammer-Assay

4.9.2.1 Prinzip des zellbasierten Flusskammer-Assays

Der zellbasierte Flusskammer-Assay^[141, 145-146] wurde in Kooperation mit Sebastian B. Riese und Dr. Jens Dornedde (Charité – Universitätsmedizin Berlin, Deutschland) durchgeführt. Wie der kompetitive SPR-Assay aus Kapitel 4.9.1.1 stellte dieser die Leukozytenadhäsion an das Endothel als Folge einer Entzündung nach, allerdings unter annähernd physiologischen Bedingungen. Lymphoide, mit L-Selektin transfizierte, K562-Zellen dienten als Modell für Leukozyten und eine mit PSGL-1 beschichtete Oberfläche als Modell für Endothelzellen. Beim Überleiten der K562-Zellen über die Oberfläche kam es zur Wechselwirkung zwischen L-Selektin und PSGL-1 und in der Folge zum Rollen der K562-Zellen auf der Oberfläche. Der Vorgang wurde mit einer Kamera verfolgt und die Anzahl der K562-Zellen, die über einen Zeitraum von einer Minute rollten, bestimmt. Bei vorheriger Inkubation der K562-Zellen mit den Aptamer-PNA•DNA-Komplexen wurde das Rollen der Zellen konzentrationsabhängig inhibiert. Je größer die Konzentration an Aptamer-PNA•DNA-Komplex war, desto weniger L-Selektin-präsentierende K562-Zellen

wechselwirkten mit dem oberflächenimmobilisierten PSGL-1 und desto weniger K562-Zellen fingen an zu rollen. Die Konzentration, bei der 50 % des Rollens inhibiert war (IC_{50}), wurde zum Affinitätsvergleich der Aptamer-PNA•DNA-Komplexe herangezogen.

4.9.2.2 Inhibierung der Selektin-Bindung durch multivalente Aptamer-PNA•DNA-Komplexe

Wie aus Kapitel 4.9.1 ersichtlich, führten nur die Aptamer-PNA•DNA-Komplexe zu einer bedeutenden Inhibierung der Wechselwirkung zwischen L-Selektin und sLe^x/sTyr. Aus diesem Grund wurde lediglich eine kleine Auswahl an Aptamer-PNA•DNA-Komplexen in einem zellbasierten Flusskammer-Assay (siehe Kapitel 4.9.2.1), d. h. unter physiologischen Bedingungen, auf ihre Fähigkeit zur Inhibierung des Rollens von Leukozyten untersucht. Im Detail wurde dabei die Wechselwirkung zwischen L-Selektin-präsentierenden K562-Zellen und PSGL-1 inhibiert.

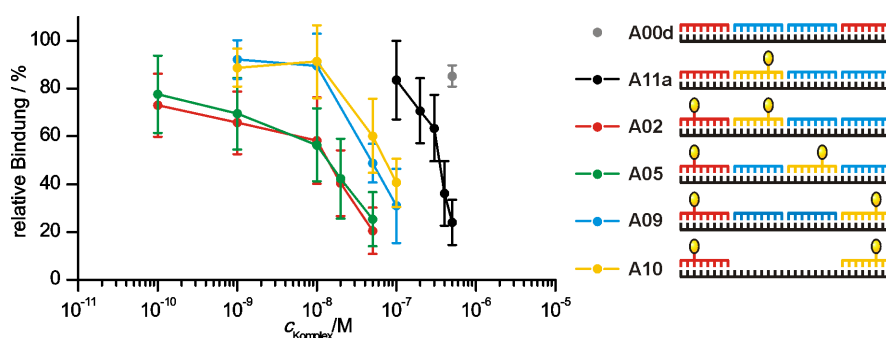








Abbildung 54: Dosis-Wirkungs-Kurven für die Inhibierung der Wechselwirkung zwischen L-Selektin-präsentierenden K562-Zellen und oberflächenimmobilisiertem PSGL-1 durch den PNA•DNA-Duplex **A00d** sowie die Aptamer-PNA•DNA-Komplexe **A02**, **A05**, **A09**, **A10** und **A11a**. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei Experimenten an. (Bedingungen: 10 min Inkubation bei 37 °C, Flussrate: 0.57 mL·min⁻¹, Puffer: Hanks' BSS)

Wie bereits zuvor, wurde zunächst das Bindungsverhalten des unmodifizierten PNA•DNA-Duplexes **A00** untersucht. Da dieser auch bei einer Konzentration von 0.5 μ M zu keiner Inhibition führte, konnten unspezifische Wechselwirkungen des Gerüsts weitgehend ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 54 und Tabelle 12). Der monovalente Aptamer-PNA•DNA-Komplex **A11a** wies hingegen einen IC_{50} von 345 nM auf. Durch Erhöhung der Valenz auf zwei Aptamer-Liganden erhöhte sich auch die Hemmwirkung um bis zu eine Größenordnung (IC_{50} = 14 – 72 nM). Die bivalenten Aptamer-Komplexe **A02**, **A05**, **A09** und **A10** banden demnach bivalent an die L-Selektin-Moleküle auf den K562-Zellen. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelte es dabei um eine bivalente Bindung an zwei benachbarte L-Selektin-Moleküle auf einer Zelle. Signifikante Unterschiede bei Variation des Abstandes zwischen 62 und 146 Å (Komplexe **A02**, **A05** und **A09**) wurden jedoch nicht beobachtet. Die Erhöhung der Flexibilität durch Einführung von Einzelstrangabschnitten führte ebenfalls zu keiner bedeutenden Änderung der Bindungsaffinität (vergleiche **A09** mit **A10**).

Tabelle 12: Konzentrationen für die 50 %ige Inhibierung (IC_{50}) der Wechselwirkung zwischen L-Selektin-präsentierenden K562-Zellen und oberflächenimmobilisiertem PSGL-1 durch den PNA•DNA-Duplex **A00d** sowie die Aptamer-PNA•DNA-Komplexe **A02**, **A05**, **A09**, **A10** und **A11a**. (Bedingungen: 10 min Inkubation bei 37 °C, Flussrate: 0.57 mL·min⁻¹, Puffer: Hanks' BSS)

	Substrat	Abstand/Å	IC_{50} /nM
A00d		-	[a]
A11a		-	345
A02		62	14
A05		104	14
A09		146	48
A10		146	72

[a] keine Inhibierung.

Im Rahmen dieses Bindungsassays konnte das Rollen der Leukozyten nur eingeschränkt durch die Aptamer-PNA•DNA-Komplexe moduliert werden. Der Abstand zwischen zwei bivalent präsentierten Aptamer-Liganden und die Flexibilität des Gerüsts beeinflussten nur geringfügig das Rollen. Dagegen hatte die Anzahl der präsentierten Liganden einen großen Einfluss auf die Affinität. Zudem banden sämtliche der bivalenten Aptamer-Komplexe mit hoher Wahrscheinlichkeit auch bivalent an die K562-Zellen.

4.9.3 Vergleich des Bindungsverhaltens der Aptamer- und der sLe^x-PNA•DNA-Komplexe

Auffälligster Unterschied zwischen den Aptamer- und den sLe^x-PNA•DNA-Komplexen war ihre Fähigkeit, die Bindung von L-Selektin-beschichteten Gold-Nanopartikeln an oberflächenimmobilisiertes sLe^x/sTyr zu inhibieren. Die Aptamer-PNA•DNA-Komplexe **A01** – **A13** wiesen IC_{50} -Werte von 1 – 12 nM auf, während die sLe^x-PNA•DNA-Komplexe **S01** – **S13** IC_{50} -Werte >20 µM hatten. Bei Zugabe der Aptamer-PNA•DNA-Komplexe fand der Übergang zwischen freiem und gebundenem Rezeptor, also L-Selektin, innerhalb eines sehr kleinen Konzentrationsbereiches statt, meist innerhalb einer Größenordnung (siehe Abbildung 50). Dies war sogar bei dem monovalenten Aptamer-PNA•DNA-Komplex **A11** der Fall. Auch wenn mit den sLe^x-PNA•DNA-Komplexen keine vollständige Inhibierung erreicht werden konnte, so war aus dem Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve (siehe Abbildung 52) ersichtlich, dass die Sättigung der Bindungstaschen der L-Selektin-Moleküle bei Zugabe von Sialyl-Lewis-X über einen wesentlich größeren Konzentrationsbereich verlief als bei Zugabe des Aptamers.

Bei Erhöhung der Valenz wurde die größte Affinitätssteigerung in beiden Fällen beim Übergang von mono- zu bivalenter Präsentation erreicht. Ebenso konnte die Affinität durch Erhöhung der Valenz von bivalenter auf tri- oder tetraivalente Präsentation nicht weiter erhöht werden, bei den sLe^x-PNA•DNA-Komplexen verringerte sie sich dabei sogar beträchtlich. Sowohl bei den Aptamer-

mer- als auch sLe^x-PNA•DNA-Komplexe waren demnach maximal zwei Liganden an der Bindung der L-Selektin-Nanopartikel beteiligt.

Der Abstand zwischen zwei bivalent präsentierten Liganden beeinflusste ebenfalls die Affinität (siehe Abbildung 55). Eine signifikante Erhöhung der Bindungsaffinität gegenüber dem jeweiligen monovalenten Komplex trat bei den bivalenten Aptamer-PNA•DNA-Komplexen jedoch nur für Abstände von 104 und 146 Å und bei den bivalenten sLe^x-PNA•DNA-Komplexen nur für einen Abstand von 127 Å auf. An dieser Stelle sei angemerkt, dass der bivalente Aptamer-PNA•DNA-Komplex, der die beiden Aptamer-Liganden in einem Abstand von 127 Å präsentierte, nicht in die Analyse einbezogen werden konnte, da dessen Bindungsverhalten durch andere Faktoren (siehe Kapitel 4.9.1.2) beeinträchtigt wurde. Basierend auf diesen Ergebnissen trat eine bivalente Bindung an zwei L-Selektin-Moleküle bevorzugt dann auf, wenn der Abstand zwischen den präsentierten Liganden 100 Å oder mehr betrug. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelte es sich dabei um eine intramolekulare Bindung an zwei benachbarte L-Selektin-Moleküle auf einem Gold-Nanopartikel. Eine intermolekulare Bindung an zwei L-Selektin-Nanopartikel war hingegen, aufgrund der geringen Konzentrationen der Bindungspartner, unwahrscheinlich. Die Bindungstaschen der L-Selektin-Moleküle waren demzufolge 100 Å oder mehr voneinander auf dem Gold-Nanopartikel entfernt.

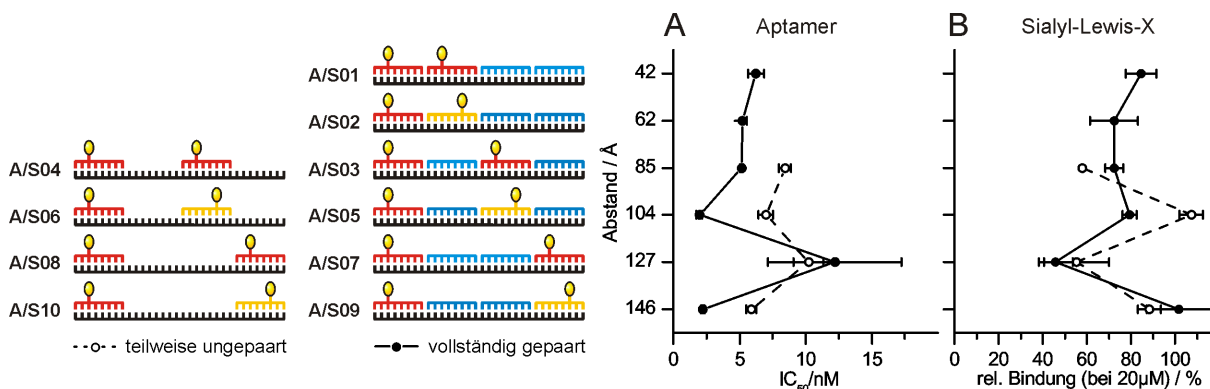


Abbildung 55: Vergleich der Bindungsaffinitäten der bivalenten Aptamer-PNA•DNA-Komplexe A01 – A10 (A) und der bivalenten sLe^x-PNA•DNA-Komplexe S01 – S10 (B). Angegeben sind bei A) die berechneten IC₅₀-Werte sowie der Standardfehler der Berechnung und bei B) der Mittelwert der relativen Bindung bei 20 µM sowie die Standardabweichung. (Bedingungen: 18 min Inkubation bei Raumtemperatur, Flussrate: 20 µL·min⁻¹, 105 s Assoziation, 180 s Dissoziation, Puffer: 20 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂)

Mit Hilfe dieses Assays konnte nur die mittlere Entfernung zwischen den Bindungstaschen von benachbarten L-Selektin-Molekülen ermittelt werden, nicht jedoch die genaue Position der Bindungstaschen im Protein. Allerdings deuten die Ergebnisse stark darauf hin, dass L-Selektin jeweils nur eine Bindungstasche für Sialyl-Lewis-X bzw. das Aptamer besaß. Dass es sich eventuell um die gleiche Bindungstasche handelte, konnte, basierend auf diesen Ergebnissen, zumindest nicht ausgeschlossen werden.

Während bei den sLe^x-PNA•DNA-Komplexen kein eindeutiger Trend beobachtet werden konnte, führte eine Erhöhung der Flexibilität des PNA•DNA-Duplexes, d. h. des Gerüsts, das die multivalent präsentierten Liganden verband, bei den Aptamer-PNA•DNA-Komplexen zu einer Verringerung der Bindungsaffinität. Im Gegensatz dazu wurde bei den Bindungsstudien der LacNAc-PNA•DNA-Komplexe mit ECL und RCA₁₂₀ (siehe Kapitel 4.8.4.2 und 4.8.4.3) stets festgestellt, dass eine Vergrößerung der Flexibilität zu einer Erhöhung der Bindungsaffinität führte. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass der Bindungsmechanismus des Aptamers an L-Selektin ein anderer war. Eine mögliche Erklärung wäre beispielsweise, dass es sich um eine „catch“-Bindung handelte.

Wenngleich bereits mehrfach gezeigt werden konnte, dass Inhibitoren, die mit dem kompetitiven SPR-Assay identifiziert worden sind, ihre inhibierende Wirkung gegenüber Selektinen auch bei Übertragung auf das natürliche System beibehalten,^[147] wurde das Bindungsverhalten auch in einem zellbasierten Flusskammer-Assay analysiert. Dieser stellte die Wechselwirkung zwischen Leukozyten und Endothelzellen unter physiologischen Bedingungen nach. Da sich in dem kompetitiven SPR-Assay jedoch herausstellte, dass die sLe^x-PNA•DNA-Komplexe nur bei sehr hohen Konzentrationen die Wechselwirkung zwischen L-Selektin und oberflächenimmobilisiertem sLe^x/sTyr inhibieren, wurden lediglich einige der Aptamer-PNA•DNA-Komplexe untersucht.

Erwartungsgemäß inhibierten in dem zellbasierten Flusskammer-Assay sämtliche der untersuchten Aptamer-PNA•DNA-Komplexe die Wechselwirkung zwischen L-Selektin und PSGL-1. Wie in dem kompetitiven SPR-Assay waren die IC₅₀-Werte im nanomolaren Bereich. Beim Übergang von monovalenter zu bivalenter Präsentation erhöhte sich die Bindungsaffinität um bis zu eine Größenordnung. Dagegen waren die Unterschiede zwischen den bivalenten Aptamer-Komplexen nur gering. Weder der Abstand zwischen den Aptamer-Liganden noch die Flexibilität des Gerüsts beeinflusste in signifikanter Weise die Bindungsaffinität gegenüber den K562-Zellen. Allerdings kam es, im Unterschied zum kompetitiven SPR-Assay, auch bei Abständen kleiner 100 Å zu einer bivalenten Bindung an zwei L-Selektin-Moleküle. Da sich die beiden L-Selektin-Moleküle mit großer Wahrscheinlichkeit auf der gleichen Zelle befanden, legt diese Beobachtung nahe, dass die räumliche Anordnung der L-Selektin-Moleküle auf den Gold-Nanopartikeln von der natürlichen Anordnung auf den Leukozyten abwich. Demzufolge war der durchschnittliche Abstand zwischen den Bindungstaschen der L-Selektin-Moleküle auf den Gold-Nanopartikeln größer.

Zusammenfassend konnte in den drei Bindungsstudien gezeigt werden, dass die Bindungsaffinität für L-Selektin mit den sLe^x- bzw. Aptamer-PNA•DNA-Komplexen moduliert werden kann. Insbesondere durch eine Erhöhung der Valenz konnte eine signifikante Affinitätssteigerung realisiert werden. Wenngleich sich die räumliche Anordnung der L-Selektin-Moleküle auf den

Gold-Nanopartikeln von der auf den Leukozyten unterschied, zeigte sich in beiden Fällen, dass der Abstand zwischen zwei bivalent präsentierten Liganden nur einen geringen Einfluss auf die Affinität hatte. Nichtsdestotrotz konnte, zumindest bei den L-Selektin-Nanopartikeln, durch Variation des Abstandes in den bivalenten Komplexen, der Bindungsmechanismus zwischen mono- und bivalenter Bindung moduliert werden. In diesem Fall fand der Übergang bei ca. 100 Å statt.

Basierend auf diesen Ergebnissen können nur eingeschränkt Aussagen über die Anordnung der L-Selektin-Moleküle auf den K562-Zellen getroffen werden. Die geringe Abstandsabhängigkeit deutet darauf hin, dass die L-Selektin-Moleküle eine gewisse Flexibilität haben und/oder nicht absolut starr in der Membran verankert sind. Die genaue Verteilung der L-Selektin-Moleküle in der Membran konnte nicht ermittelt werden.

Die Interaktion zwischen Selektinen und seinen Liganden war Gegenstand zahlloser Studien.^[46] Neben dem Einfluss der Valenz wurde dabei auch der des Abstandes zwischen den präsentierten Liganden auf das Bindungsverhalten untersucht. Beispielsweise wurden kurze Peptidketten als Gerüst zur Präsentation von zwei oder drei sLe^x-Liganden in unterschiedlichen Abständen verwendet.^[148-149] Im Unterschied zu den hier verwendeten sLe^x- bzw. Aptamer-PNA•DNA-Komplexen war der Abstand zwischen den einzelnen Liganden mit maximal 39 Atomen relativ kurz. Größter Nachteil dieser Gerüste war jedoch, dass eine genaue Vorhersage der räumlichen Anordnung der präsentierten Liganden, aufgrund der hohen Flexibilität der verwendeten Peptide, nicht möglich war.

Roskamp *et al.* funktionalisierten Gold-Nanopartikel mit verschiedenen Kohlenhydrat-Mimetika und untersuchten den Einfluss des Partikeldurchmessers auf die Bindungsaffinität.^[150] Die Partikel hatten Durchmesser von 60 und 140 Å. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Partikelgröße und Bindungsaffinität für L-Selektin konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, da die Dichte und die Anzahl der präsentierten Liganden, je nach verwendetem Ligand, nur eingeschränkt kontrolliert werden konnten und demzufolge unterschiedlich waren. Weinhart *et al.* verfolgten einen ähnlichen Ansatz indem sie dendritische Polyglycerolsulfate als Gerüst zur multivalenten Präsentation verwendeten.^[146] Aufgrund des Vorliegens von zwei Schwellenwerten erhöhte sich die Bindungsaffinität, bei Vergrößerung des Partikeldurchmessers von 30 auf 170 Å, jedoch stufenweise und nicht linear. Die Autoren begründeten dieses Verhalten mit der Tatsache, dass die Größe der Partikel zu einem gewissen Grad durch die hohe Flexibilität des Dendrimer-Rückgrats kompensiert wurde.

Wenngleich beide Beispiele zeigen, dass die Bindungsaffinität für Selektine durch die räumliche Anordnung der präsentierten Liganden moduliert werden kann, so war ein entscheidender

Nachteil beider Gerüste, dass die Variation der räumliche Präsentation der Liganden auf Veränderungen der Polymerisations- und Funktionalisierungsgrade beschränkt war. Eine zusätzliche Variation war zwar durch eine Modulation der Größe bzw. Masse der Gerüste möglich, doch war eine hohe Präzision, aufgrund der flexiblen Natur der Gerüste, nicht gegeben. Im Gegensatz dazu waren die sLe^x- bzw. Aptamer-PNA•DNA-Komplexe exakt definiert. Die Präsentation der Liganden im Raum konnte mit Ångström-genauer Präzision vorhergesagt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

5.1 Zusammenfassung

Der Großteil der bisherigen Studien zur Untersuchung multivalenter Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydraten und Lektinen befasste sich hauptsächlich mit dem Einfluss der Valenz auf die Bindungsaffinität. Die räumliche Orientierung der Liganden im Raum spielte hingegen nur eine untergeordnete Rolle. Größtes Hindernis für eine systematische Untersuchung des Einflusses der räumlichen Anordnung der präsentierten Liganden auf das Bindungsverhalten stellte die Generierung von multivalenten Kohlenhydrat-Architekturen dar, deren Strukturen zum einen vorhersagbar und zum anderen mit atomarer Auflösung definiert waren. Auf der Suche nach hoch definierten Strukturen sind in den letzten Jahren vermehrt Nukleinsäuregerüste in den Fokus gerückt. Aufgrund ihrer definierten Struktur und der Tatsache, dass diese punktgenau modifiziert werden können, eignen sich diese hervorragend als Gerüst für die multivalente Präsentation.

In dieser Arbeit wurden Nukleinsäuren verwendet, um Kohlenhydrat-Liganden mit hoher räumlicher Präzision im Raum zu positionieren. Die eingesetzten Architekturen basierten auf einem modular aufgebauten PNA•DNA-Duplex. In diesem diente ein langer DNA-Einzelstrang als Templat, der vier Anticodons codierte. Kurze PNA-Einzelstränge, die teilweise mit Kohlenhydrat-Liganden funktionalisiert waren, fungierten als Codons, welche mit den Anticodons hybridisierten. Die gebildeten multivalenten Kohlenhydrat-PNA•DNA-Duplexe wiesen eine definierte Struktur auf und positionierten die präsentierten Liganden mit hoher Präzision im Raum.

Zum Aufbau der multivalenten PNA•DNA-Komplexe wurden Kohlenhydrat-PNA-Konjugate **21** hergestellt. Bei der Synthese der Kohlenhydrat-Liganden wurde zunächst ein Aminoethyl-Linker, welcher die spätere Anbringung an die PNA ermöglichte, in das Glucosamin **24** eingeführt (siehe

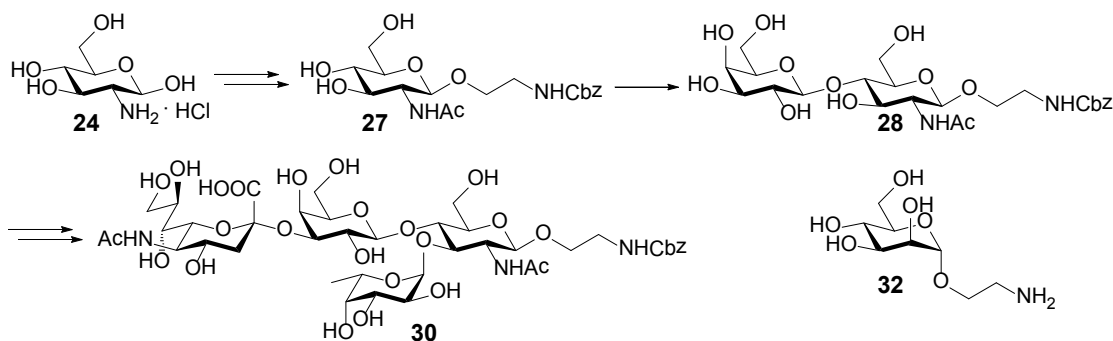


Abbildung 56: Übersicht über die synthetisierten Aminoethyl-funktionalisierten Glykoside von *N*-Acetylglucosamin (**28**), Sialyl-Lewis-X (**30**) und Mannose (**32**).

Abbildung 56). In drei konsekutiven, chemoenzymatischen Glykosylierungen wurde das Glucosaminid **27** mit hoher Ausbeute und Selektivität zunächst zum *N*-Acetyllactosaminid **28** und anschließend zum Sialyl-Lewis-X-Glykosid **30** erweitert. Außerdem wurde das, ebenfalls mit einem Aminoethyl-Linker-modifizierte, Mannosid **32** hergestellt. Zur späteren Kupplung wurden die Kohlenhydrat-Liganden mit einer Maleinimid-Funktionalität versehen. Für die Modifikation der PNA-Oligomere mit den Kohlenhydrat-Liganden wurde das rückgratmodifizierte PNA-Monomer **19**, welches zuvor synthetisiert wurde, in die PNA-Oligomere **20** eingebaut (siehe Abbildung 57). Dieses war mit einer Thiol-Seitenkette versehen und ermöglichte die anschließende Verknüpfung mit den Maleinimid-funktionalisierten Kohlenhydrat-Liganden in sehr guten Ausbeuten.

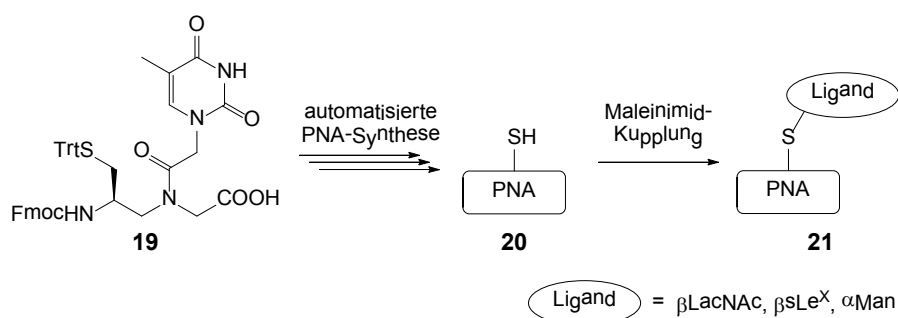


Abbildung 57: Übersicht über die Darstellung der Kohlenhydrat-PNA-Konjugate **21**.

Unter Verwendung von einigen wenigen Kohlenhydrat-PNA-Konjugaten konnte, bei Hybridisierung dieser mit komplementären DNA-Templatsträngen, eine Fülle an multivalenten Kohlenhydrat-PNA•DNA-Komplexen mit relativ geringem synthetischem Aufwand erzeugt werden (siehe Abbildung 58). Durch Sequenzvariation des DNA-Templats konnten die Anzahl der Liganden sowie der Abstand zwischen diesen eingestellt werden. Ebenso konnte die Flexibilität des Gerüsts, an das die Liganden angebracht waren, durch Einführung von Einzelstrangbrüchen und -abschnitten moduliert werden.

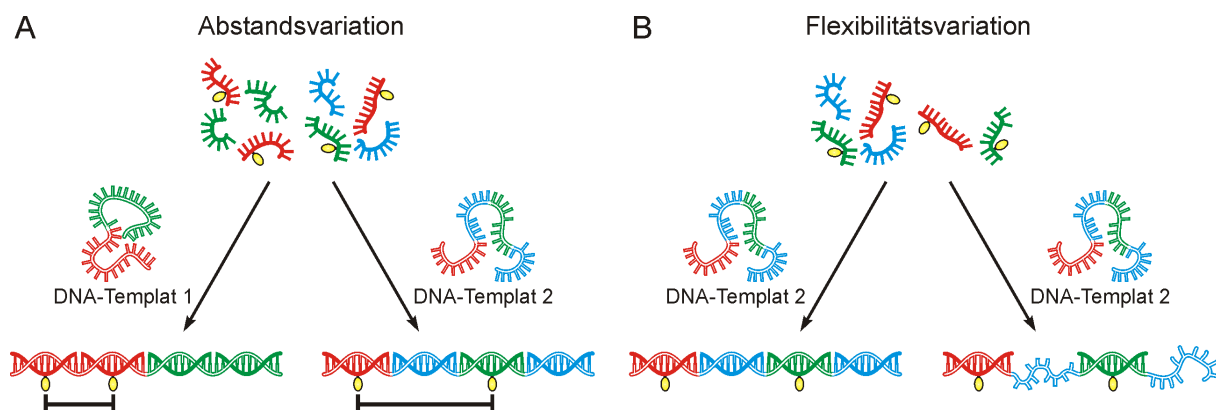


Abbildung 58: Modularer Aufbau der Kohlenhydrat-PNA•DNA-Komplexe. Der Abstand zwischen den präsentierten Liganden (A) sowie die Flexibilität der modular aufgebauten Kohlenhydrat-PNA•DNA-Komplexe (B) kann mit hoher Präzision variiert werden.

In einer Reihe von SPR-basierten Bindungsassays wurde das Bindungsverhalten der multivalenten Kohlenhydrat-PNA•DNA-Komplexe gegenüber den multivalenten Lektinen ECL, RCA₁₂₀ und ConA untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch Variation der drei Parameter Anzahl, Abstand und Flexibilität die Bindungsaffinität der multivalenten Kohlenhydrat-PNA•DNA-Komplexe derart moduliert werden kann, dass diese als Werkzeug für die räumliche Rasterung von Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen eingesetzt werden können. So konnte bei der Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen den bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexen und ECL eine klare Abstandsabhängigkeit der Bindungsaffinität beobachtet werden (siehe Abbildung 59A). Der Abstand, für den die höchste Bindungsaffinität detektiert wurde, stimmte mit der Distanz der Bindungstaschen in ECL, wie sie mittels Kristallstrukturanalyse ermittelt wurde, überein. Bei den Untersuchungen mit RCA₁₂₀ konnten hingegen zwei Abstände identifiziert werden, die zu einer erhöhten Affinität führten (siehe Abbildung 59B). Während einer der Abstände mit der räumlichen Anordnung der primären Bindungstaschen in RCA₁₂₀ übereinstimmte, wurde der zweite Abstand auf die Existenz einer, bisher nicht identifizierten, sekundären Bindungstasche zurückgeführt. Eine bivalente Bindung an eine primäre und eine sekundäre Bindungsstelle wäre eine plausible Erklärung für die hohe Affinität. Entsprechende Untersuchungen zur Belegung dieser These wurden jedoch nicht durchgeführt. Im Fall von ConA war eine räumliche Rasterung der Bindungsstellen nicht möglich, da eine Bestimmung der Bindungsaffinitäten mittels des SPR-basierten Assays nicht möglich war.

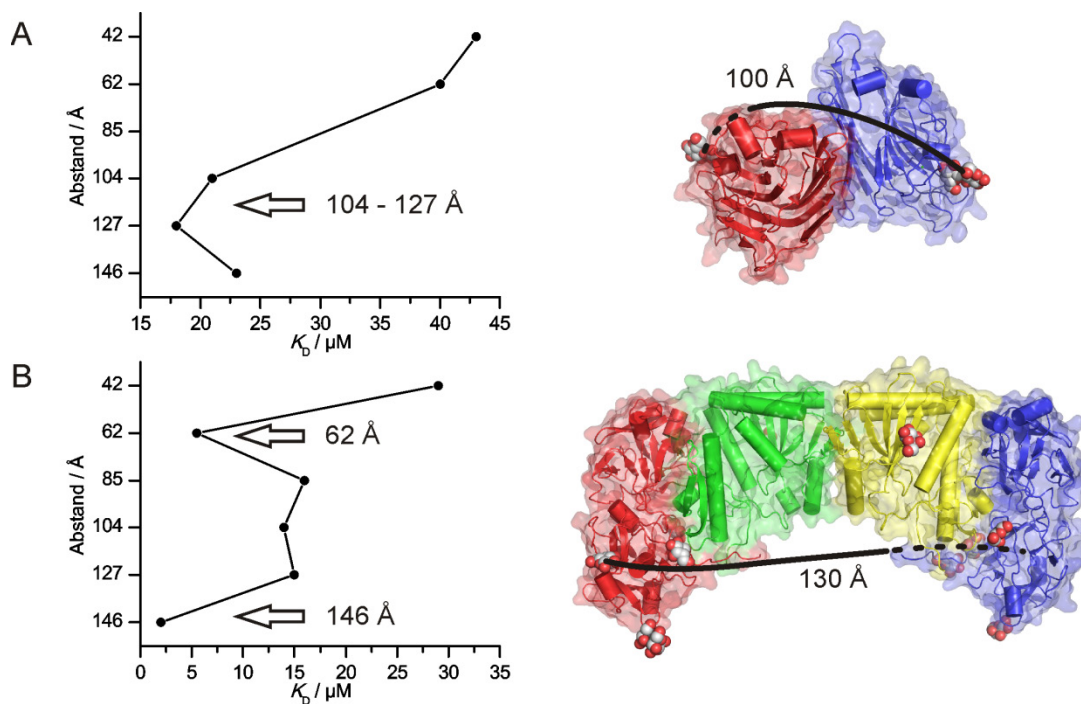


Abbildung 59: Räumliche Rasterung der Kohlenhydrat-Bindungstaschen von A) ECL und B) RCA₁₂₀. Links sind die Dissoziationskonstanten in Abhängigkeit vom Abstand zwischen zwei bivalent präsentierten LacNAc-Liganden gezeigt. Die Dissoziationskonstanten wurden in einem SPR-basierten Assay unter Annahme einer Langmuir-Kinetik bestimmt. Rechts sind die Abstände zwischen den Bindungstaschen, wie sie aus den Kristallstrukturen (ECL: 1uzp.pdb;^[111] RCA₁₂₀: 1rzo.pdb^[75]) ermittelt wurden, angegeben.

Durch Einführung von Einzelstrangbrüchen und -abschnitten konnte zudem die Flexibilität der multivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexe erhöht werden. Der Fakt, dass eine höhere Flexibilität auch zu einer stärkeren Bindung an ECL und RCA₁₂₀ führte, war in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass bei beiden Lektinen eine simultane Bindung beider Bindungstaschen für gebogene Substrate bevorzugt war. Neben dem Abstand zwischen zwei Liganden und der Flexibilität des Gerüsts, das diese verband, konnte auch die Anzahl der präsentierten Liganden genau eingestellt werden. Durch Erhöhung der Valenz von mono- auf tetravalente Präsentation konnte die relative Bindungsstärke pro LacNAc-Ligand bei ECL und RCA₁₂₀ um den Faktor 182 bzw. 24 erhöht werden. Die Dissoziationskonstante konnte dadurch in beiden Fällen um zwei Größenordnungen verringert werden.

Zusätzlich zu dem SPR-basierten Assay wurde die Wechselwirkung der Lac-PNA•DNA-Komplexe mit ECL auch in einem Enzym-gekoppelten Lektin-Assay (ELLA) und einem Fluoreszenzanisotropie-Assay untersucht. Während in dem SPR-basierten Assay sowohl inter- als auch intramolekulare Wechselwirkungen registriert werden konnten, wurden in dem Fluoreszenzanisotropie-Assay nur intermolekulare Wechselwirkungen beobachtet. Da diese zudem zur Aggregation der Ligand-Lektin-Komplexe führten, konnte der Fluoreszenzanisotropie-Assay nicht zur Quantifizierung der Bindungsaffinitäten herangezogen werden. Im Gegensatz dazu konnte in dem ELLA nur eine monovalente Bindung an ECL detektiert werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die experimentellen Rahmenbedingungen des eingesetzten Bindungsassays mitunter einen großen Einfluss auf die untersuchten Wechselwirkungen haben können und bei der Analyse der Messergebnisse berücksichtigt werden müssen.^[113-114]

Mit diesen Studien konnte gezeigt werden, dass die multivalenten Kohlenhydrat-PNA•DNA-Komplexe als molekulares Lineal zur räumlichen Rasterung von Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen mit atomarer Auflösung eingesetzt werden können. Die Anzahl der präsentierten Liganden, der Abstand zwischen diesen und die Flexibilität des Gerüsts, das diese verbindet, können einerseits fein moduliert werden und sind andererseits sehr gut vorhersagbar. Beide Merkmale stellen entscheidende Vorteile gegenüber einem Großteil der Gerüste dar, die bisher in räumlichen Rasterungen eingesetzt wurden.^[57-66] Aus diesem Grund wurde dieses Werkzeug im nächsten Schritt zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Selektinen und seinen Liganden verwendet. Dabei handelt es sich um eine multivalente Wechselwirkung, die während der Leukozytenadhäsionskaskade^[3] auftritt und, im Gegensatz zu den bisher untersuchten Systemen, nur unvollständig bezüglich der räumlichen Präsentation der beteiligten Bindungspartner charakterisiert ist. Neben dem natürlichen Sialyl-Lewis-X-Liganden wurde der PNA•DNA-Duplex auch zur multivalenten Präsentation eines artifiziell generierten Aptamers verwendet.

Zunächst wurde in einem kompetitiven SPR-Assay die Bindung von L-Selektin-beschichteten Gold-Nanopartikeln an oberflächenimmobilisiertes sLe^x/sTyr durch Zugabe von sLe^x- bzw. Aptamer-PNA•DNA-Komplexen inhibiert. In beiden Fällen banden maximal zwei Liganden an L-Selektin. Außerdem konnte die Bindungsaffinität für L-Selektin beide Male durch Veränderungen der räumlichen Anordnung der präsentierten Liganden moduliert werden (siehe Abbildung 60). Wenngleich der Einfluss des Abstands auf das Bindungsverhalten klein war, kam es nur dann zu einer bivalenten Bindung mit den L-Selektin-Nanopartikeln, wenn der Abstand zwischen den präsentierten sLe^x- bzw. Aptamer-Liganden größer als 100 Å war.

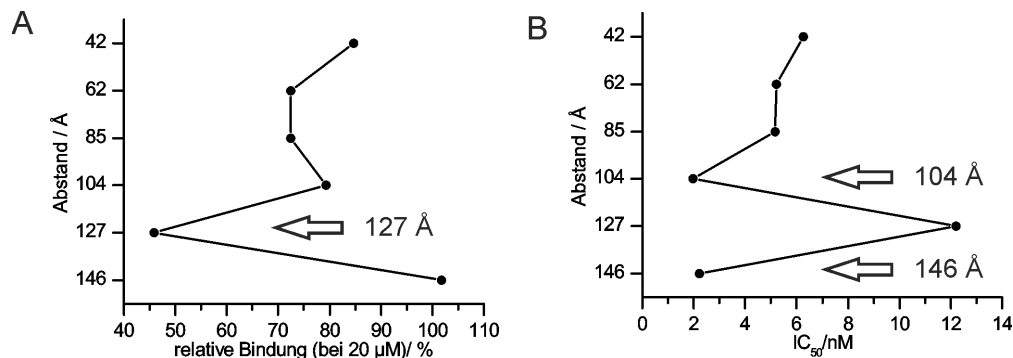


Abbildung 60: Räumliche Rasterung von L-Selektin unter Verwendung von A) Sialyl-Lewis-X und B) einem Aptamer als Liganden. Die Bindungsaffinitäten wurden in einem kompetitiven SPR-Assay bestimmt.

Basierend auf den Ergebnissen konnte keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob das Aptamer an die gleiche Bindungstasche wie Sialyl-Lewis-X band. Die Tatsache, dass die Affinität bei Erhöhung der Flexibilität des Gerüsts nicht zu- sondern abnahm, unterstrich jedoch die Besonderheit der Aptamer-L-Selektin-Wechselwirkung und wies darauf hin, dass es sich eventuell um eine „catch“-Bindung handelte.

Anschließend wurde das Bindungsverhalten der Aptamer-PNA•DNA-Komplexe unter physiologischen Bedingungen untersucht. Im Detail wurde dabei das Rollen von L-Selektin-präsentierenden Leukozyten über eine Oberfläche, die mit PSGL-1 beschichtet war, inhibiert. Beim Übergang von mono- zu bivalenter Präsentation vergrößerte sich die Hemmwirkung um bis zu eine Größenordnung. Der Abstand zwischen zwei bivalent präsentierten Liganden sowie die Flexibilität des Gerüsts hatten hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Bindungsaffinität. Auch wenn die räumliche Anordnung der L-Selektin-Moleküle in der Membran der Leukozyten nicht ermittelt werden konnte, deutet die geringe Abstandsabhängigkeit zumindest darauf hin, dass die L-Selektin-Moleküle eine gewisse Flexibilität haben und/oder nicht absolut starr in der Membran verankert sind.

5.2 Ausblick

Die in dieser Arbeit hergestellten multivalenten Kohlenhydrat-PNA•DNA-Komplexe stellen ein leistungsfähiges Werkzeug für die räumliche Rasterung von Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen dar. Für die Zukunft ist zu erwarten, dass dieses Werkzeug einen festen Stellenwert in der Charakterisierung von Proteinen, deren Strukturen nicht durch z. B. Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie zugänglich sind, haben wird. Des Weiteren können mit diesem Werkzeug auch komplexe Proben untersucht werden, d. h. Systeme, die durch das Zusammenspiel mehrerer verschiedener Proteine gekennzeichnet sind. Als Beispiel sei die in dieser Arbeit untersuchte Wechselwirkung zwischen multivalenten Sialyl-Lewis-X-Liganden und mehreren L-Selektin-Molekülen genannt, bei der zwar die Kristallstruktur von L-Selektin seit Jahren bekannt war, über die relative Anordnung mehrerer L-Selektin-Moleküle zueinander, so wie sie in der natürlichen Umgebung auf den Leukozyten vorkommen, hingegen nur wenig Informationen vorlagen.

Trotz des augenscheinlichen Potentials dieses Werkzeugs ergeben sich noch einige Möglichkeiten der Optimierung. So stellt die geringe Löslichkeit von PNA bei sehr hohen Konzentrationen eine entscheidende Limitierung dar. Durch die Einführung von weiteren Lysin-Einheiten an den Termini der PNA-Oligomere oder die Verwendung von PNA-Monomeren, deren Rückgrat mit polaren Aminosäuren wie Lysin (lysPNA) oder Arginin (argPNA) modifiziert ist, könnte die Löslichkeit erhöht werden.^[151-152]

Das hier behandelte System beschränkte sich auf die multivalente Präsentation in einer Dimension. Durch die Einführung von Verzweigungen^[153] in dem Duplex oder die Verwendung von Triplex- oder Quadruplexabschnitten^[154] können zwei- und dreidimensionale Nukleinsäurearchitekturen erzeugt werden, die eine dreidimensionale Untersuchung multivalenter Wechselwirkungen ermöglichen. Dabei sind die Architekturen nicht nur auf Präsentation von Kohlenhydrat-Liganden beschränkt, sondern können, wie bereits mit der multivalenten Präsentation eines Aptamers gezeigt, für die Präsentation von nahezu jedem beliebigen Molekül, sofern es nicht die Duplexausbildung stört, verwendet werden.

Neben der Möglichkeit, die multivalenten Ligand-PNA•DNA-Komplexe als molekulares Lineal einzusetzen, können die erzeugten Architekturen auch selbst hochaffine Binder darstellen, die als potente Wirkstoffe für die Behandlung von Krankheiten Verwendung finden können. Erst kürzlich zeigten Appella und Mitarbeiter das Potential von modular aufgebauten PNA•DNA-Komplexen zur Generierung von hochpotenten Integrin-Antagonisten auf.^[155] Die Aktivität des erzeugten multivalenten Peptid-PNA•DNA-Komplexes übertraf auch *in vivo* in Mausmodellen die des monovalenten Peptids um zwei Größenordnungen.

Einer interessanten Idee zufolge können Ligand-PNA-Konjugate auch als Antisense-Wirkstoffe in der Zelle Anwendung finden. Der Aufbau der, in diesem Fall, multivalenten PNA•RNA-Komplexe würde analog den hier beschriebenen PNA•DNA-Komplexen erfolgen, mit dem Unterschied, dass mRNA als Templat fungieren würde. Dabei werden die Sequenzen der Ligand-PNA-Konjugate so entworfen, dass diese nur mit einer bestimmten mRNA hybridisieren, d. h. die Ausbildung des multivalenten PNA•RNA-Komplexes ist an die Transkription dieser spezifischen mRNA gekoppelt. Im Gegensatz zu den monovalenten Ligand-PNA-Konjugaten hätte der erzeugte multivalente Ligand-PNA•RNA-Komplex, aufgrund multivalenter Wechselwirkungsmechanismen, eine hohe Affinität für sein Zielprotein und würde dieses dadurch effektiver aktivieren oder inaktivieren. Mit diesem Ansatz der „molekularen Doktoren“ wäre es z. B. möglich, Wirkstoffe zu entwickeln, die ausschließlich jene Zellen adressieren, die infolge einer krankhaften Fehlfunktion ein bestimmtes Gen überexprimieren.

6. EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 Geräte und Materialien

6.1.1 Lösungsmittel und Reagenzien

Alle Reaktionen mit feuchtigkeits- oder sauerstoffempfindlichen Substanzen wurden in ausgeheizten Apparaturen unter Argon-Atmosphäre durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Reaktionen bei Raumtemperatur durchgeführt. Lösungsmittel für die Säulenchromatographie, zur Extraktion und Umkristallisation waren von technischer Qualität und wurden mittels Destillation gereinigt und gegebenenfalls nach Standardverfahren getrocknet. Alle weiteren käuflichen Substanzen wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Dr. Warren Wakarchuk (National Research Council Canada, Kanada) stellte die *Campylobacter jejuni* α -2,3-Sialyltransferase (Konstrukt CST-06) (EC 2.4.99.6)^[94-95] zur Verfügung. Chun-Hung Lin, Ph.D. (Academia Sinica, Taiwan) stellte die *Helicobacter pylori* α -1,3-Fucosyltransferase (EC 2.4.1.152)^[99] zur Verfügung. β -1,4-Galactosyltransferase aus Kuhmilch (EC 2.4.1.22), CMP-Sialinsäure-Synthetase von *Neisseria meningitidis* Gruppe B (EC 2.7.7.43), Rinderserum Albumin und Asialofetuin wurden von Sigma-Aldrich erworben. Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (EC 3.1.3.1), Galactose-1-phosphat, Uridin-5'-monophosphat und Guanosin-5'-diphosphat wurden von AppliChem GmbH, Deutschland erworben. *Erythrina cristagalli* Lektin (ECL), Biotinyliertes *Erythrina cristagalli* Lektin (Biotin~ECL), *Ricinus communis* Agglutinin (RCA₁₂₀), Concanavalin A (ConA) und Streptavidin-markierte Meerrettichperoxidase (Konzentrat, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) wurden von Linaris Biologische Produkte GmbH, Deutschland erworben. Immunglobulin G-markiertes L-Selektin (rekombinantes humanes L-Selektin/CD62L, Fc Chimäre) und Immunglobulin G-markiertes PSGL-1 (rekombinantes humanes PSGL-1/CD162, Fc Chimäre) wurden von R&D Systems, USA erworben. Protein A-beschichtete Gold-Nanopartikel (Protein A Gold 15 nm) wurden von Biotrend Chemikalien GmbH, Deutschland erworben. Biotinyliertes sLe^x/sTyr-PAA (20 mol% Sialyl-Lewis-X, 5 mol% Sulfotyrosin, 5 mol% Biotin) und biotinyliertes LacNAc-PAA (20 mol% N-Acetyllactosamin, 5 mol% Biotin) wurden von Lectinity Holdings Inc., Russland erworben. PNA-Monomere wurden von ASM Research Chemicals, Deutschland oder Panagene, Korea erworben. HCTU und NovaSyn® TGR-Harz wurden von Novabiochem erworben. DNA-Oligomere wurden von Biotez Berlin-Buch GmbH, Deutschland oder metabion GmbH, Deutschland bezogen und waren HPLC-gereinigt. SYBR® Gold (Konzentrat, 10000x) wurde bei Invitrogen, USA gekauft. 1-Step Turbo TMB Lösung wurde bei Thermo Fisher Scientific gekauft. Sensor-Chips CM5 und SA (jeweils research grade), Amin-Kupplungskit und HBS-EP-Puffer wurden von GE Healthcare erworben.

Hanks' BSS-Puffer wurde von PAA Laboratories GmbH, Österreich erworben. Alle weiteren Chemikalien wurden von Acros, Sigma-Aldrich oder Merck erworben.

6.1.2 Chromatographische Methoden

6.1.2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Für dünnschichtchromatographische Analysen kamen mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumplatten der Firma Merck (Typ 60-F₂₅₄, Schichtdicke 0.2 mm) zum Einsatz. Angegeben sind R_F-Werte (Laufhöhe, relativ zur Laufmittelfront). Neben der Detektion der Fluoreszenzauslöschung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm wurden die Chromatogramme mit folgenden Tauchreagenzien angefärbt: ethanolische Schwefelsäure (5 mL konzentrierte Schwefelsäure, 95 mL Ethanol), Seebach-Reagenz (1.0 g Cer(IV)-sulfat-Tetrahydrat, 2.5 g Molybdätophosphorsäure, 94 mL Wasser, 6 mL konzentrierte Schwefelsäure).

6.1.2.2 Säulenchromatographie

Säulenchromatographische Trennungen wurden bei erhöhtem Druck (Flash-Chromatographie^[156]) an Kieselgel 60 der Firma Acros (Korngröße: 0.035 – 0.070 mm) durchgeführt.

6.1.2.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Analytische, semi-präparative und präparative HPLC- bzw. UPLC-Trennungen wurden je nach Analyt an einer der folgenden Anlagen durchgeführt:

- 1) Analytische HPLC-Anlage des Typs LaChrom Elite der Firma Merck-Hitachi mit einem Dioden-Array-Detektor ($\lambda = 200 - 600$ nm).
- 2) Analytische HPLC-MS-Anlage der Firma Agilent der Serie 1100 mit einem UV-Detektor ($\lambda = 210, 220, 260$ nm) und einem VL-Quadrupol Massenspektrometer der Firma Agilent.
- 3) Analytische UPLC-MS-Anlage des Typs Acquity UPLC® der Firma Waters mit einem UV-Detektor ($\lambda = 210, 220, 260$ nm) und einem VL-Quadrupol Massenspektrometer der Firma Agilent.
- 4) Analytische/semi-präparative HPLC-Anlage des Typs 1105 der Firma Gilson mit einem UV-Detektor ($\lambda = 210, 220, 260$ nm).
- 5) Semi-präparative/präparative HPLC-Anlage der Firma Agilent der Serie 1100 mit einem UV-Detektor ($\lambda = 210, 220, 260$ nm).

Die verwendeten stationären Phasen sind in Tabelle 13 aufgelistet. Als mobile Phase kamen folgende Lösungsmittelgemische zum Einsatz:

A1: 98.9 % Wasser / 1 % Acetonitril / 0.1 % Trifluoressigsäure

B1: 98.9 % Acetonitril / 1 % Wasser / 0.1 % Trifluoressigsäure

A2: 98.9 % Wasser / 1 % Acetonitril / 0.1 % Ameisensäure

B2: 98.9 % Acetonitril / 1 % Wasser / 0.1 % Ameisensäure

A3: 0.1 M Triethylammoniumacetat pH 6.5

B3: Acetonitril

Tabelle 13: Stationäre Phasen, die für analytische, semi-präparative und präparative HPLC- bzw. UPLC-Trennungen verwendet wurden.

Säule	Modell	HPLC-Anlage, Typ	Temper- atur/°C	Flussrate/ mL·min ⁻¹	Mobile Phase
1	Varian Polaris C18-A, 250 x 4.6 mm, 5 µm, Porenweite: 180 Å	Merck-Hitachi, analytisch	55	1	A1/B1
2	Varian Polaris C18-A, 100 x 2.0 mm, 3 µm, Porenweite: 180 Å	Agilent, analytisch	55	0.3	A2/B2
3	Macherey-Nagel Nucleodur® C18 Gravity, 125 x 2 mm, 3 µm, Porenweite: 110 Å	Agilent, analytisch	55	0.3	A2/B2
4	Waters Acquity UPLC® BEH300 C18, 100 x 2.1 mm, 1.7 µm, Porenweite: 300 Å	Waters, analytisch	55	0.6	A3/B3
5	Waters XBridge™ BEH130 C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm, Porenweite: 130 Å	Gilson, analytisch	55	1	A3/B3
6	Waters XBridge™ BEH130 Prep C18, 150 x 10 mm, 5 µm, Porenweite: 130 Å	Gilson, semi- präparativ	55	4	A3/B3
7	Varian Polaris C18-A, 250 x 10.0 mm, 5 µm, Porenweite: 180 Å	Agilent, semi- präparativ	RT	6	A1/B1
8	Macherey-Nagel Nucleodur® C18 Gravity, 250 x 10 mm, 5 µm, Porenweite: 110 Å	Agilent, semi- präparativ	RT	6	A1/B1
9	Macherey-Nagel Nucleodur® C18 Gravity, 250 x 21 mm, 5 µm, Porenweite: 110 Å	Agilent, präparativ	RT	15	A1/B1

6.1.3 Schmelzpunkte

Schmelzpunkte wurden mit einem NAGEMA K8 gemessen und waren nicht korrigiert.

6.1.4 Polarimetrie

Die Drehwertbestimmung erfolgte bei der Natrium-D-Linie ($\lambda = 587 \text{ nm}$) in Küvetten mit einer Schichtdicke von 100 mm in einem 241-Polarimeter der Firma Perkin-Elmer. Die Temperatur und das Lösungsmittel sind jeweils angegeben.

6.1.5 NMR-Spektroskopie

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden mit Spektrometern des Typs AVANCE II 300, AVANCE II 400, AVANCE II 500 und AVANCE 600 der Firma Bruker gemessen. Als interner Standard für die ^1H -NMR-Spektren diente das Restprotonensignal des deuterierten Lösungsmittels (CDCl_3 : $\delta = 7.16$; CD_3OD : $\delta = 4.84$; d_6 -DMSO: $\delta = 2.50$, D_2O : $\delta = 4.79$). Zur Kennzeichnung der Multiplizität der Signale werden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), t(dd) (Pseudotriplett), m (Multiplett), m_c (zentriertes Multiplett), br (verbreitertes Signal). Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben. Die ^{13}C -NMR-Spektren wurden ^1H -breitbandentkoppelt gemessen und mit dem Signal des deuterierten Lösungsmittels (CDCl_3 : $\delta = 77.16$; CD_3OD : $\delta = 49.05$; d_6 -DMSO: $\delta = 39.43$) referenziert. Die chemischen Verschiebungen sind in Einheiten der δ -Skala (ppm – parts per million) angegeben.

6.1.6 Massenspektrometrie

MALDI-TOF-Massenspektren (Matrix: Sinapinsäure) wurden mit einer Voyager-DE™ Pro Biospectrometry Workstation der Firma PerSeptive Biosystems oder einem Spektrometer des Typs Reflex III der Firma Bruker gemessen. Für PNA-Oligomere wurde eine Sinapinsäure-Matrix (10 mg Sinapinsäure in 1.00 mL Wasser/Acetonitril (1:1, v/v), 0.1 % Trifluoressigsäure), für DNA-Oligomere eine THAP-Matrix (Gemisch aus 55.80 mg 2,4,6-Trihydroxyacetophenon-Monohydrat in 1.00 mL Ethanol und 11.3 mg Diammoniumhydrogencitrat in 0.50 mL Wasser) verwendet.

HR-ESI-FT-ICR-Massenspektren wurden mit Spektrometern des Typs LTQ FT oder LTQ FT Ultra der Firma Thermo Finnigan gemessen. ESI-QIT-Massenspektren wurden mit einem Spektrometer des Typs LCQ Deca XP der Firma Thermo Finnigan gemessen. ESI-QP-Massenspektren wurden mit einem VL-Quadrupol Massenspektrometer der Serie 1100 der Firma Agilent gemessen.

6.1.7 UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-Absorptionsspektren wurden mit einem Gerät des Typs ND-1000 Spectrophotometer der Firma NanoDrop Technologies gemessen.

Für die Konzentrationsbestimmung von ECL, Biotin~ECL, RCA₁₂₀, Lac~FAM **67** sowie den Aptamer- und Kohlenhydrat-PNA-Konjugaten wurden diese in Wasser oder entsprechenden Puffer gelöst und die UV/Vis-Absorptionsspektren der Lösungen aufgenommen. Die Konzentrationen wurden mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz^[118] berechnet. Die molaren Extinktionskoeffizienten λ_{260} der PNA- bzw. DNA-Oligomere wurden mit dem OligoAnalyzer der Firma Integrated DNA Technologies nach der Nearest-Neighbor-Methode^[157-158] berechnet. Die Absorption eventuell daran gebundener Kohlenhydrat-Liganden wurde vernachlässigt. Alle weiteren molaren Extinktionskoeffizienten wurden der Literatur entnommen und bezogen sich, sofern nicht anders angegeben, auf neutrale pH-Bedingungen: ECL und Biotin~ECL (beide M = 54000 Da): Lac~FAM **67** (pH 9.0): $\lambda_{492} = 78000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$,^[159] $\lambda_{280} = 82620 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$,^[120] RCA₁₂₀ (M = 120000 Da): $\lambda_{280} = 138720 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$,^[160]

6.1.8 Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie an Mikrotiterplatten

Absorptions- und Fluoreszenzmessungen an Mikrotiterplatten wurden mit einem Plattenlesegerät des Typs FLUOstar OPTIMA der Firma BMG Labtech durchgeführt. Absorptionsmessungen wurden in 384er-Mikrotiterplatten (hochbindend, F-Boden, transparent, Polystyrol) der Firma Greiner Bio-One GmbH, Deutschland und Fluoreszenzmessungen in 384er-Mikrotiterplatten (nichtbindend, F-Boden, schwarz, Polystyrol) der Firma Nunc A/S, Dänemark durchgeführt.

6.1.9 Denaturierungsexperimente

Denaturierungsexperimente wurden auf einem Gerät des Typs Cary 100 Bio UV/Vis Spektrophotometer der Firma Varian durchgeführt. Dazu wurde 1 mL einer 0.5 μM Lösung des entsprechenden Komplexes (Zusammensetzung siehe Kapitel 6.3) in Puffer (10 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.0) in eine 1 mL UV/Vis-Küvette des Typs 114-QS der Firma Hellma gefüllt. Mittels eines Peltier-temperierten Küvettenhalters wurde die Lösung von 20 °C auf 90 °C erhitzt (10 °C·min⁻¹). Danach wurden vier Temperaturzyklen durchlaufen. Bei jedem Zyklus wurde die Lösung zunächst von 90 °C auf 20 °C abgekühlt (10 °C·min⁻¹), dann die Temperatur für 5 Minuten konstant bei 20 °C gehalten und anschließend wieder von 20 °C auf 90 °C erhitzt (0.5 °C·min⁻¹). Bei jedem Zyklus wurde während der Heizphase die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm aufgenommen und diese als Funktion der Temperatur aufgetragen. Die Schmelztemperaturen wurden durch Ermittlung der Maxima der ersten Ableitungen der erhaltenen Schmelzkurven bestimmt. Es wurde jeweils der Mittelwert aus 4 Schmelzkurven bestimmt.

6.1.10 Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)

Die SPR-Experimente wurden auf einem BIAcore X Gerät der Firma Biacore AB bei 25 °C durchgeführt.

6.1.11 Flusskammermessungen

Der zellbasierte Flusskammer-Assay wurde in einer Flusskammer des Typs μ -slide VI – flat der Firma ibidi GmbH, Martinsried unter Verwendung einer Nanoliter Infusionspumpe des Typs KDS101 der Firma KD Scientific Inc., USA durchgeführt. Zur Visualisierung wurde ein mit einer Kamera des Typs AxioCam MRc der Firma Carl Zeiss AG, Jena ausgestattetes inverses Mikroskop IM der Firma Carl Zeiss AG, Oberkochen verwendet.

6.1.12 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden in einer Apparatur des Typs Mini Trans-Blot Cell der Firma Bio-Rad durchgeführt. Für die Stromversorgung kam ein Gerät des Typs PowerPac™ HC der Firma Bio-Rad zum Einsatz.

Verwendete Puffer:

10x TBE-Puffer: 108 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 55 g Borsäure und 40 mL einer 0.5 M EDTA-Lösung mit Wasser auf 1000 mL verdünnt.

0.5x TBE-Puffer: 50 mL 10x TBE-Puffer mit Wasser auf 1000 mL verdünnt.

Denaturierende Trennmedien:

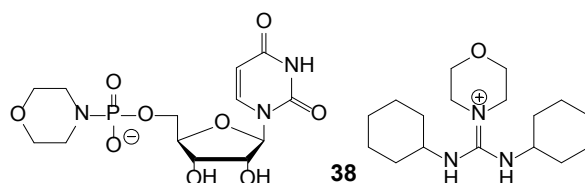
Für die Herstellung von 2 Polyacrylamid-Trenngelen (15 %, 100 x 70 mm, Breite x Länge) wurden 15 mL Polyacrylamid-Lösung (15 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1, v/v) in 0.5x TBE-Puffer (v/v), 7 M Harnstoff) mit 75 μ L Ammoniumpersulfat-Lösung (10 % in Wasser, m/m) und 15 μ L *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin versetzt. Die Lösung wurde kurz geschüttelt, zentrifugiert und vorsichtig in beide Gelkammern gegossen. Die Gele wurden jeweils mit einem Kamm versehen und waren nach 30 Minuten vollständig polymerisiert. Die polymerisierten Gele wurden in die Gelelektrophoreseapparatur eingespannt. Als Elektrolyt kam 0.5x TBE-Puffer zum Einsatz. Die Proben wurden mit 1 μ L 6x Formamid-Ladepuffer (9.8 mL Formamid, 0.2 mL 0.5 M EDTA-Lösung, 2.6 mg Bromphenolblau) versetzt, mit Wasser auf ein Volumen von 6 μ L verdünnt, kurz auf 90 °C erwärmt und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur in die Geltaschen pipettiert. Anschließend wurde an die Gele eine Spannung von 300 V für 20 – 30 Minuten angelegt.

Analyse der Trennmedien:

Die Gele wurden aus der Gelelektrophoreseapparatur entnommen und für 5 Minuten mit SYBR® Gold (1x in 0.5x TBE-Puffer) angefärbt. Die Auslesung der fluoreszierenden Banden erfolgte mit einer Kodak Image Station 4000MM Pro ($\lambda_{\text{Ex}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 535 \text{ nm}$).

6.1.13 PNA-Festphasensynthese

Die automatisierte PNA-Festphasensynthese wurde mit einem Peptidsynthesizer des Typs ResPep der Firma Intavis AG durchgeführt. Reaktoren des Typs microscale column for PNA-synthesis der Firma Intavis AG wurden verwendet.

6.2 Synthesevorschriften**6.2.1 UDP-Galactose****6.2.1.1 Uridin-5'-monophosphomorpholidat-4-Morpholin-*N,N'*-dicyclohexylcarboxamidinsalz (38)**

Die Synthese wurde analog einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift^[82] durchgeführt. Abweichend davon wurde der Reaktionsfortschritt nicht mittels Gelelektrophorese verfolgt und das Produkt mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie charakterisiert. Ausgehend von 440 mg (1.36 mmol) Uridin-5'-monophosphorsäure (36) wurden 643 mg (69 %) Uridin-5'-monophosphomorpholidat-4-Morpholin-*N,N'*-dicyclohexylcarboxamidinsalz (38) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 1.01 - 1.13$ (m, 2 H, 2x CH-(CH₂-CH₂)₂-CH_{2a}), 1.24 (q, $J = 12.8 \text{ Hz}$, 4 H, 2x CH-(CH₂-CH_{2a})₂-CH₂), 1.39 (q, $J = 12.4 \text{ Hz}$, 4 H, 2x CH-(CH_{2a}-CH₂)₂-CH₂), 1.56 (d, $J = 12.5 \text{ Hz}$, 2 H, 2x CH-(CH₂-CH₂)₂-CH_{2b}), 1.70 (d, $J = 12.9 \text{ Hz}$, 4 H, 2x CH-(CH₂-CH_{2b})₂-CH₂), 1.77 (d, $J = 10.9 \text{ Hz}$, 4 H, 2x CH-(CH_{2b}-CH₂)₂-CH₂), 2.65 (t, $J = 4.6 \text{ Hz}$, 3.6 H, 0.9 Äq HN-(CH₂-CH₂)₂-O), 2.85 – 2.95 (m, 4 H, P-N-(CH₂-CH₂)₂-O), 3.17 – 3.27 (m, 2 H, 2x CH-(CH₂-CH₂)₂-CH₂), 3.30 – 3.36 (m, 4 H, C_q-N-(CH₂-CH₂)₂-O), 3.41 – 3.47 (m, 4 H, P-N-(CH₂-CH₂)₂-O), 3.49 (t, $J = 4.6 \text{ Hz}$, 3.6 H, 0.9 Äq HN-(CH₂-CH₂)₂-O), 3.58 – 3.67 (m, 4 H, C_q-N-(CH₂-CH₂)₂-O), 3.74 – 3.82 (m, 2 H, 5'-CH₂), 3.92 – 3.95 (m, 1 H, 4'-CH), 4.02 (dd, $^3J = 4.8 \text{ Hz}$, $^3J = 3.2 \text{ Hz}$, 1 H, 3'-CH), 4.06 (t(dd), $^3J = 5.3 \text{ Hz}$,

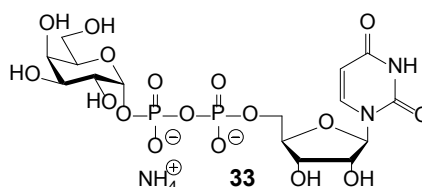
1 H, 2'-CH), 5.53 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 1 H, 5-CH), 5.78 (d, $^3J = 5.7$ Hz, 1 H, 1'-CH), 7.97 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 1 H, 6-CH).

^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 24.77$, 24.79 (2x CH-(CH₂-CH₂)₂-CH₂), 32.83 (2x CH-(CH₂-CH₂)₂-CH₂), 45.52 (P-N-(CH₂-CH₂)₂-O), 46.04 (0.9 Äq HN-(CH₂-CH₂)₂-O), 48.11 (C_q-N-(CH₂-CH₂)₂-O), 53.92 (2x CH-(CH₂-CH₂)₂-CH₂), 63.78 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.0$ Hz, 5'-CH₂), 65.82 (C_q-N-(CH₂-CH₂)₂-O), 66.88 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.6$ Hz, P-N-(CH₂-CH₂)₂-O), 67.33 (0.9 Äq HN-(CH₂-CH₂)₂-O), 70.65 (3'-CH), 73.79 (2'-CH), 84.09 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.2$ Hz, 4'-CH), 87.62 (1'-CH), 101.66 (5-CH), 141.04 (6-CH), 150.82 (1-C_q), 157.02 (C_q-N-(CH₂-CH₂)₂-O), 163.10 (3-C_q).

^{31}P -NMR (202 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 5.51$ (O-PO₂⁻-N).

m/z (ESI-QIP-MS): 392.1 (ber. für C₁₃H₁₉N₃O₉P⁻ [M - (OC₄H₈)-N=C-(NH-C₆H₁₁)₂]⁻: 392.0864).

6.2.1.2 Uridin-5'-diphospho- α -D-galactose-Monoammoniumsalz (**33**)

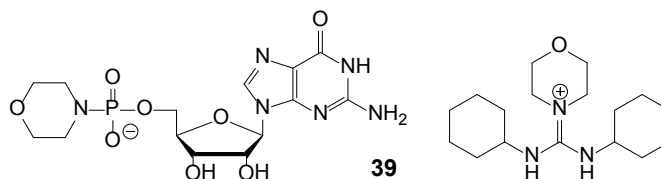


Die Synthese wurde analog einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift^[81] durchgeführt. Abweichend davon wurde auf eine Reinigung via Größenausschlusschromatographie verzichtet und das Produkt mittels Massenspektrometrie charakterisiert. Ausgehend von 200 mg (537 μmol) α -D-Galactose-1-phosphat-Dikaliumsalz-Dihydrat wurden 326 mg Uridin-5'-diphospho- α -D-galactose-Monoammoniumsalz (**33**), das mit Uridin-5'-monophosphat und Diuridintriphosphat verunreinigt war, als schwach gelber Feststoff erhalten.

m/z (HR-ESI-FT-ICR-MS): 565.0466 (ber. für C₁₅H₂₃N₂O₁₇P₂⁻ [M - NH₃]⁻: 565.0477).

6.2.2 GDP-Fucose

6.2.2.1 Guanosin-5'-monophosphomorpholidat-4-Morpholin- N,N' -dicyclohexylcarboxamidinsalz (**39**)



Die Synthese wurde analog einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift^[82] durchgeführt. Abweichend davon wurde der Reaktionsfortschritt nicht mittels Gelelektrophorese verfolgt und das

Produkt mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie charakterisiert. Ausgehend von 827 mg (2.46 mmol) Guanosin-5'-monophosphorsäure (**37**) wurden 1.22 g (68 %) Guanosin-5'-monophosphomorpholidat-4-Morpholin-*N,N'*-dicyclohexylcarboxamidinsalz (**39**) als farbloser Feststoff erhalten.

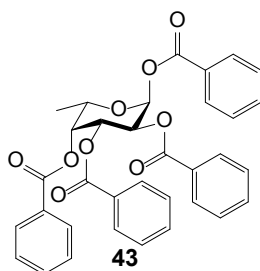
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.01 – 1.12 (m, 2 H, 2x $\text{CH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{CH}_{2a}$), 1.23 (q, J = 12.7 Hz, 4 H, 2x $\text{CH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_{2a})_2-\text{CH}_2$), 1.38 (q, J = 12.1 Hz, 4 H, 2x $\text{CH}-(\text{CH}_{2a}-\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2$), 1.55 (d, J = 12.3 Hz, 2 H, 2x $\text{CH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{CH}_{2b}$), 1.70 (d, J = 12.7 Hz, 4 H, 2x $\text{CH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_{2b})_2-\text{CH}_2$), 1.77 (d, J = 10.6 Hz, 4 H, 2x $\text{CH}-(\text{CH}_{2b}-\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2$), 2.65 (t, J = 4.6 Hz, 0.6 H, 0.15 Äq $\text{HN}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{O}$), 2.88 – 2.95 (m, 4 H, P-N- $(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{O}$), 3.18 – 3.26 (m, 2 H, 2x $\text{CH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2$), 3.30 – 3.35 (m, 4 H, $\text{C}_q\text{-N}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{O}$), 3.41 – 3.47 (m, 4 H, P-N- $(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{O}$), 3.49 (t, J = 4.6 Hz, 0.6 H, 0.15 Äq $\text{HN}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{O}$), 3.59 – 3.65 (m, 4 H, $\text{C}_q\text{-N}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{O}$), 3.76 – 3.82 (m, 1 H, 5'- CH_{2a}), 3.85 – 3.92 (m, 1 H, 5'- CH_{2b}), 3.97 (dd, 3J = 7.1 Hz, 3J = 3.7 Hz, 1 H, 4'-CH), 4.20 (dd, 3J = 4.4 Hz, 3J = 3.5 Hz, 1 H, 3'-CH), 4.48 (t(dd), 3J = 5.4 Hz, 1 H, 2'-CH), 5.68 (d, 3J = 5.9 Hz, 1 H, 1'-CH), 6.82 (s, 2 H, NH_2), 7.91 (s, 1 H, 8-CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO-d_6): δ = 24.75 (2x $\text{CH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2$), 32.82 (2x $\text{CH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2$), 45.48 (P-N- $(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{O}$), 46.04 (0.15 Äq $\text{HN}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{O}$), 48.10 ($\text{C}_q\text{-N}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{O}$), 53.89 (2x $\text{CH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2$), 64.00 (d, $^2J_{\text{CP}}$ = 5.3 Hz, 5'- CH_2), 65.77 ($\text{C}_q\text{-N}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{O}$), 66.82 (d, $^3J_{\text{CP}}$ = 7.3 Hz, P-N- $(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{O}$), 67.32 (0.15 Äq $\text{HN}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{O}$), 70.97 (3'-CH), 73.88 (2'-CH), 84.00 (d, $^3J_{\text{CP}}$ = 7.3 Hz, 4'-CH), 86.62 (1'-CH), 116.58 (5- C_q), 135.37 (8-CH), 151.40 (4- C_q), 154.08 (2- C_q), 157.04 ($\text{C}_q\text{-N}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{O}$), 157.12 (6- C_q).

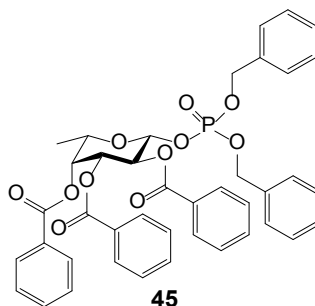
$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, DMSO-d_6): δ = 5.91 (O- $\text{PO}_2\text{-N}$).

m/z (ESI-QIT-MS): 431.2 (ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_8\text{P}^- [\text{M} - (\text{OC}_4\text{H}_8)\text{-N}=\text{C}-(\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_{11})_2]^-$: 431.1086).

6.2.2.2 1,2,3,4-Tetra-*O*-benzoyl- α -L-fucose (**43**)

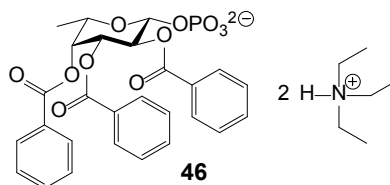


Die Synthese wurde analog einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift^[83] durchgeführt. Ausgehend von 1.07 g (6.52 mmol) L-Fucose (**42**) wurden 3.78 g (quantitativ) 1,2,3,4-Tetra-*O*-benzoyl- α -L-fucose (**43**) als farbloser Schaum erhalten. Die NMR-spektroskopischen Daten waren in Übereinstimmung mit der Literatur.^[83]

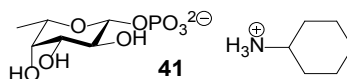
6.2.2.3 2,3,4-Tri-*O*-benzoyl- β -L-fucose-1-dibenzylphosphat (45)

Die Synthese wurde analog den in der Literatur beschriebenen Vorschriften^[83-84] durchgeführt. Abweichend davon wurde die säulenchromatographische Reinigung mit Cyclohexan/Essigsäureethylester (2:1→1:1, v/v) durchgeführt. Ausgehend von 1.04 g (1.79 mmol, 1.0 Äq) 1,2,3,4-Tetra-*O*-benzoyl- α -L-fucose (**43**) wurden 769 mg (58 %) 2,3,4-Tri-*O*-benzoyl- β -L-fucose-1-dibenzylphosphat (**45**) als farbloser Schaum erhalten. Die NMR-spektroskopischen Daten waren in Übereinstimmung mit der Literatur.^[84]

R_f: 0.13 (Cyclohexan/Essigsäureethylester, 65:35, v/v).

6.2.2.4 2,3,4-Tri-*O*-benzoyl- β -L-fucose-1-phosphat-Bis(triethylammonium)-salz (46)

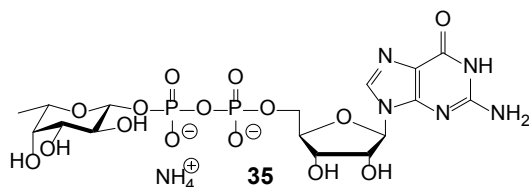
Die Synthese wurde analog einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift^[85] durchgeführt. Ausgehend von 720 mg (977 μ mol) 2,3,4-Tri-*O*-benzoyl- β -L-fucose-1-dibenzylphosphat (**45**) wurden 658 mg (89 %) 2,3,4-Tri-*O*-benzoyl- β -L-fucose-1-phosphat-Bis(triethylammonium)-salz (**46**) als farbloser Schaum erhalten, die sofort umgesetzt wurden.

6.2.2.5 β -L-Fucose-1-phosphat-Cyclohexylammoniumsalz (41)

Die Synthese wurde analog einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift^[85] durchgeführt. Ausgehend von 632 mg (833 μ mol) 2,3,4-Tri-*O*-benzoyl- β -L-fucose-1-phosphat-Bis(triethylammonium)-salz (**46**) wurden 317 mg (97 %) β -L-Fucose-1-phosphat-Cyclohexylammoniumsalz (**41**) erhalten.

(**41**) als farbloser Schaum erhalten. Die NMR-spektroskopischen Daten waren in Übereinstimmung mit der Literatur.^[85]

6.2.2.6 Guanosin-5'-diphospho- β -L-fucose-Monoammoniumsalz (**35**)

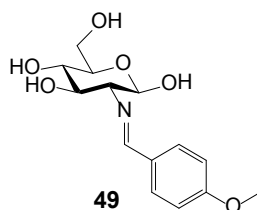


Die Synthese wurde analog einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift^[81] durchgeführt. Abweichend davon wurde auf eine Reinigung via Größenausschlusschromatographie verzichtet und das Produkt mittels Massenspektrometrie charakterisiert. Ausgehend von 57 mg (145 μ mol) β -L-Fucose-1-phosphat-Triethylammoniumsalz (**48**), welches laut NMR 1.4 Äquivalente Triethylamin enthielt, wurden 100 mg Guanosin-5'-diphospho- β -L-fucose-Monoammoniumsalz (**35**), das mit Guanosin-5'-monophosphat und Diguanosintriphosphat verunreinigt war, als schwach gelber Feststoff erhalten.

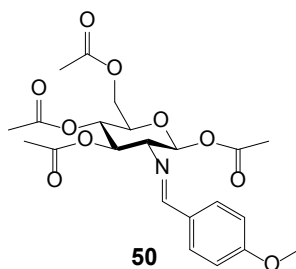
m/z (HR-ESI-FT-ICR-MS): 588.0722 (ber. für $C_{16}H_{24}N_5O_{15}P_2^-$ [M - NH_3]: 588.0750).

6.2.3 Kohlenhydrat-Liganden

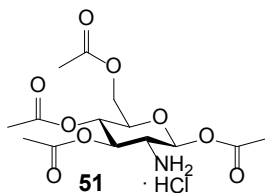
6.2.3.1 *N*-(4-Methoxybenzyliden)- β -D-glucosamin (**49**)



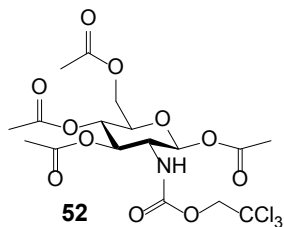
Die Synthese wurde analog einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift^[87] durchgeführt. Ausgehend von 10.00 g (46.37 mmol) D-Glucosaminhydrochlorid (**24**) wurden 11.71 g (85 %) *N*-(4-Methoxybenzyliden)- β -D-glucosamin (**49**) als farbloser Feststoff erhalten. Die NMR-spektroskopischen Daten waren in Übereinstimmung mit der Literatur.^[161]

6.2.3.2 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-*N*-(4-methoxybenzyliden)- β -D-glucosamin (50)

Die Synthese wurde analog einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift^[87] durchgeführt. Ausgehend von 7.50 g (25.2 mmol) *N*-(4-Methoxybenzyliden)-D-glucosamin (**49**) wurden 7.06 g (60 %) 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-*N*-(4-methoxybenzyliden)- β -D-glucosamin (**50**) als farblose Plättchen erhalten. Die NMR-spektroskopischen Daten waren in Übereinstimmung mit der Literatur.^[161]

6.2.3.3 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucosaminhydrochlorid (51)

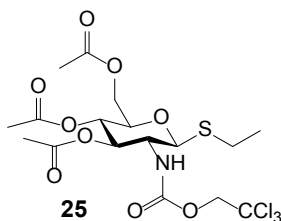
Die Synthese wurde analog einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift^[87] durchgeführt. Ausgehend von 9.06 g (19.46 mmol) 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-*N*-(4-methoxybenzyliden)- β -D-glucosamin (**50**) wurden 7.12 g (95 %) 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucosaminhydrochlorid (**51**) als schwachgelber Feststoff erhalten. Die NMR-spektroskopischen Daten waren in Übereinstimmung mit der Literatur.^[161]

6.2.3.4 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-*N*-((2,2,2-trichlorethoxy)carbonyl)- β -D-glucosamin (52)

Die Synthese wurde analog einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift^[88] durchgeführt. Abweichend davon wurde die chromatographische Reinigung mit Cyclohexan/Essigsäureethylester (2:1→1:1, v/v) durchgeführt und das Produkt aus Cyclohexan/Essigsäureethylester umkristallisiert. Ausgehend von 3.80 g (9.90 mmol) 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucosaminhydrochlorid

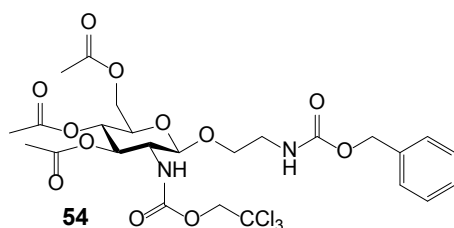
(**51**) wurden 4.53 g (88 %) 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-*N*-((2,2,2-trichlorethoxy)carbonyl)- β -D-glucosamin (**52**) als farbloser Feststoff erhalten. Die NMR-spektroskopischen Daten waren in Übereinstimmung mit der Literatur.^[88]

6.2.3.5 Ethyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-1-thio-*N*-(2,2,2-trichlorethyloxycarbonyl)- β -D-glucosaminid (**25**)



Die Synthese wurde analog einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift^[88] durchgeführt. Abweichend davon wurde die chromatographische Reinigung mit Cyclohexan/Essigsäureethylester (2:1, v/v) durchgeführt und auf eine Umkristallisation verzichtet. Ausgehend von 6.22 g (11.90 mmol) 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-*N*-((2,2,2-trichlorethoxy)carbonyl)- β -D-glucosamin (**52**) wurden 5.09 g (81 %) Ethyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-1-thio-*N*-(2,2,2-trichlorethyloxycarbonyl)- β -D-glucosaminid (**25**) als farbloser Feststoff erhalten. Die NMR-spektroskopischen Daten waren in Übereinstimmung mit der Literatur.^[88]

6.2.3.6 (*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)-3,4,6-tri-*O*-acetyl-*N*-(2,2,2-trichlorethyloxy-carbonyl)- β -D-glucosaminid (**54**)



Die Synthese basierte auf einer in der Literatur^[89] beschriebenen Vorschrift. Unter Argon-Atmosphäre wurde eine Suspension von 100.0 mg (190.5 μ mol, 1.24 \AA q) Ethyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-1-thio-*N*-(2,2,2-trichlorethyloxycarbonyl)- β -D-glucosaminid (**25**), 30.0 mg (153.7 μ mol, 1.0 \AA q) Benzyl-*N*-(2-hydroxyethyl)carbammat (**26**)^[162] und frisch ausgeheizten Molekularsieb (4 \AA) in 4 mL trockenen Dichlormethan 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 132 mg (511 μ mol, 3.3 \AA q) Dimethyl(thiomethyl)sulfonium-trifluormethansulfonat (**53**)^[163] zugegeben und weitere 65 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde über Celite® 545 filtriert, das Lösungsmittel des Filtrats unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt und der erhaltene Rückstand säulenchromatographisch (Cyclohexan/Essigsäureethylester, 3:1 \rightarrow 1:1, v/v)

gereinigt. Es wurden 50.4 mg (50 %) *N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)-3,4,6-tri-*O*-acetyl-*N*-(2,2,2-trichlorethyloxycarbonyl)- β -D-glucosaminid (**54**) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f : 0.42 (Cyclohexan/Essigsäureethylester, 1:2, v/v).

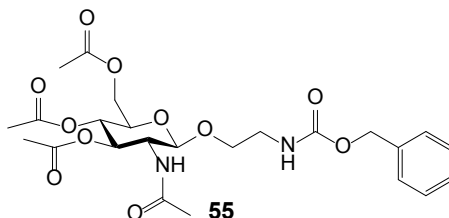
Smp.: 102 – 104 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 2.02 (s, 3 H, CH_3), 2.03 (s, 3 H, CH_3), 2.06 (s, 3 H, CH_3), 3.25 – 3.40 (m, 1 H, $\text{CH}_{2a}\text{-NHCbz}$), 3.40 – 3.54 (m, 1 H, $\text{CH}_{2b}\text{-NHCbz}$), 3.57 – 3.75 (m, 3 H, 2-CH, 5-CH, $\text{CH}_{2a}\text{-CH}_2\text{-NHCbz}$), 3.87 (ddd, 2J = 9.9 Hz, 3J = 6.0 Hz, 3J = 3.6 Hz, 1 H, $\text{CH}_{2b}\text{-CH}_2\text{-NHCbz}$), 4.13 (dd, 2J = 12.2 Hz, 3J = 2.2 Hz, 1 H, 6- CH_{2a}), 4.24 (dd, 2J = 12.3 Hz, 3J = 4.9 Hz, 1 H, 6- CH_{2b}), 4.52 (d, 2J = 12.0 Hz, 1H, $\text{CH}_{2a}\text{-CCl}_3$), 4.58 (d, 3J = 8.3 Hz, 1H, 1-CH), 4.76 (d, 2J = 12.0 Hz, 1 H, $\text{CH}_{2b}\text{-CCl}_3$), 4.99 – 5.13 (m, 3 H, 4-CH, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 5.13 – 5.29 (m, 3 H, 3-CH, NH-Cbz, NH-Troc), 7.30 – 7.37 (m, 5 H, Ph- H_5).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 20.57, 20.66 (3x CH_3), 40.67 ($\text{CH}_2\text{-NHCbz}$), 56.16 (2-CH), 61.91 (6- CH_2), 66.77 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 68.42 (4-CH), 69.24 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NHCbz}$), 71.84 (3-CH, 5-CH), 74.36 ($\text{CH}_2\text{-CCl}_3$), 95.38 (CCl_3), 100.99 (1-CH), 128.13, 128.16, 128.52 (5x Ph-CH), 136.40 (Ph- C_q), 154.23 ($[\text{C}_q=\text{O}]^{\text{Cbz}}$), 156.48 (C_q^{Troc}), 169.39, 170.6, 170.65 (3x C_q^{Ac}).

m/z (ESI-QIT-MS): 679.1 (ber. für $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{NaO}_{12}^+$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 679.0835).

6.2.3.7 *N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)-3,4,6-tri-*O*-acetyl-*N*-acetyl- β -D-glucosaminid (**55**)



Die Synthese basierte auf einer in der Literatur^[89] beschriebenen Vorschrift. Eine Suspension von 50.0 mg (76.00 μmol , 1 Äq) *N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)-3,4,6-tri-*O*-acetyl-*N*-(2,2,2-trichlorethyloxycarbonyl)- β -D-glucosaminid (**54**) und 1.30 g (19.88 mmol, 262 Äq) frisch aktivierten Zink in 2.0 mL (34.94 mmol, 460 Äq) Essigsäure wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde über Celite® 545 filtriert, das Gel mit Essigsäureethylester und Dichlormethan gewaschen und das Lösungsmittel des Filtrats unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt. Unter Argon-Atmosphäre wurden zu dem erhaltenen Rückstand 4.0 mL (49.46 mmol, 651 Äq) Pyridin und 2.0 mL (21.16 mmol, 278 Äq) Essigsäureanhydrid gegeben und 2.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde unter vermindertem Druck bei 40 °C zur Trockne eingengt und der erhaltene Rückstand in 5 mL Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 3 mL 1 M Salzsäure, 4 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 5 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen,

wobei nach jedem Waschvorgang mit je 5 mL Dichlormethan reextrahiert wurde. Die vereinigten organischen Phase wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt und der erhaltene Rückstand säulenchromatographisch (Chloroform/ Methanol, 9:1, v/v) gereinigt. Es wurden 31.0 mg (78 %) (*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)-3,4,6-tri-*O*-acetyl-*N*-acetyl- β -D-glucosaminid (**55**) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f 0.49 (Chloroform/Methanol, 9:1, v/v).

Smp.: 169 – 170 °C.

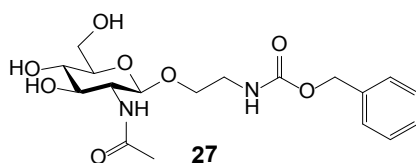
$[\alpha]_D^{24} = -9.0^\circ \text{ mL dm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ($c = 1.00 \text{ g mL}^{-1}$ in Aceton).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.87$ (s, 3 H, CH_3), 2.01 (s, 3 H, CH_3), 2.02 (s, 3 H, CH_3), 2.04 (s, 3 H, CH_3), 3.31 (dddd, $^2J = 14.4 \text{ Hz}$, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, $^3J = 5.4 \text{ Hz}$, $^3J = 3.5 \text{ Hz}$, 1 H, $\text{CH}_{2a}\text{-NHCbz}$), 3.40 – 3.48 (m, 1 H, $\text{CH}_{2b}\text{-NHCbz}$), 3.66 (ddd, $^3J = 10.0 \text{ Hz}$, $^3J = 4.8 \text{ Hz}$, $^3J = 2.5 \text{ Hz}$, 1 H, 5-CH), 3.66 – 3.70 (m, 1 H, $\text{CH}_{2a}\text{-CH}_2\text{-NHCbz}$), 3.85 (ddd, $^2J = 10.4 \text{ Hz}$, $^3J = 6.0 \text{ Hz}$, $^3J = 3.5 \text{ Hz}$, 1 H, $\text{CH}_{2b}\text{-CH}_2\text{-NHCbz}$), 3.89 (m, 1 H, 2-CH), 4.12 (dd, $^2J = 12.3 \text{ Hz}$, $^3J = 2.4 \text{ Hz}$, 1 H, 6- CH_{2a}), 4.22 (dd, $^2J = 12.3 \text{ Hz}$, $^3J = 4.9 \text{ Hz}$, 1 H, 6- CH_{2b}), 4.59 (d, $^3J = 8.3 \text{ Hz}$, 1 H, 1-CH), 5.04 (t(dd), $^3J = 9.7 \text{ Hz}$, 1 H, 4-CH), 5.08 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 5.18 (t(dd), $^3J = 10.0 \text{ Hz}$, 1 H, 3-CH), 5.32 (br t, $^3J = 5.1 \text{ Hz}$, 1 H, NH-Cbz), 5.73 (d, $^3J = 8.7 \text{ Hz}$, 1 H, NH-Ac), 7.28 – 7.36 (m, 5 H, Ph-H_5).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): $\delta = 20.55$, 20.63, 20.64, 23.19 (4x CH_3), 40.70 ($\text{CH}_2\text{-NHCbz}$), 54.46 (2-CH), 61.99 (6- CH_2), 66.63 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 68.39 (4-CH), 68.96 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NHCbz}$), 71.87 (5-CH), 72.33 (3-CH), 101.05 (1-CH), 128.08, 128.11, 128.47 (5x Ph-CH), 136.50 (Ph-C_q), 156.46 ($(\text{C}_q=\text{O})^{\text{Cbz}}$), 169.29, 170.46, 170.63, 170.94 (4x C_q^{Ac}).

m/z (HR-ESI-FT-ICR-MS): 525.2076 (ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_{11}^+$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 525.2079).

6.2.3.8 (*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)-*N*-acetyl- β -D-glucosaminid (**27**)



Die Synthese basierte auf einer in der Literatur^[91] beschriebenen Vorschrift. Unter Argon-Atmosphäre wurde eine Spatelspitze Natriummethanolat zu einer Lösung von 21.1 mg (40.23 μmol) (*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)-3,4,6-tri-*O*-acetyl-*N*-acetyl- β -D-glucosaminid (**55**) in 2 mL trockenen Methanol gegeben und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Essigsäure/Methanol (1:20, v/v) neutralisiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 16.0 mg (quantitativ) (*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)-*N*-acetyl- β -D-glucosaminid (**27**) als farbloser Feststoff erhalten.

Smp.: 187 – 188 °C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -22.2^\circ \text{ mL dm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ($c = 1.01 \text{ g mL}^{-1}$ in Ethanol).

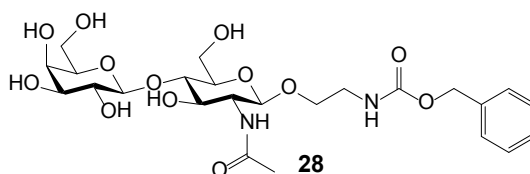
HPLC: $t_R = 11.3 \text{ min}$ (3→50 % B2 in 20 min, Säule 3).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): $\delta = 1.95$ (s, 3 H, CH_3), 3.22 – 3.32 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-NHCbz}$), 3.38 – 3.44 (m, 2 H, 4-CH, 5-CH), 3.51 (m, 1 H, 3-CH), 3.61 – 3.73 (m, 3 H, 2-CH, 6- CH_{2a} , $\text{CH}_{2a}\text{-CH}_2\text{-NHCbz}$), 3.83 – 3.91 (m, 2 H, 6- CH_{2b} , $\text{CH}_{2b}\text{-CH}_2\text{-NHCbz}$), 4.47 (d, $^3J = 8.4 \text{ Hz}$, 1 H, 1-CH), 5.03 – 5.12 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 7.35 – 7.45 (m, 5 H, Ph-H_5).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O): $\delta = 22.11$ (CH_3), 40.34 ($\text{CH}_2\text{-NHCbz}$), 55.52 (2-CH), 60.72 (6- CH_2), 66.90 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 68.63 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NHCbz}$), 69.89 (5-CH), 73.75 (3-CH), 75.86 (4-CH), 101.24 (1-CH), 127.81, 128.41, 128.79 (5x Ph-CH), 136.40 (Ph-C_q), 158.26 ($[(\text{C}_q=\text{O})^{\text{Cbz}}]$), 174.58 (C_q^{Ac}).

m/z (HR-ESI-FT-ICR-MS): 399.1759 (ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_8^+$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 399.1762).

6.2.3.9 (*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)-*N*-acetyl- β -D-lactosaminid (**28**)



Zu einer Lösung von 3.5 mg (17.7 μmol) Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat und 0.92 mg Rinder-serumalbumin in 854 μL 0.1 M HEPES-Puffer (pH 7.0) wurden 8.3 mg (20.8 μmol) (*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)-*N*-acetyl- β -D-glucosaminid (**27**) und 48.5 mg Uridin-5'-diphospho- α -D-galactose-Monoammoniumsalz (**33**), das mit Uridin-5'-monophosphat und Diuridintriphosphat verunreinigt war, gegeben. Anschließend wurde eine Lösung von 0.17 mg (17 U) alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (EC 3.1.3.1) in 70.6 μL 0.1 M HEPES-Puffer (pH 7.0) zugegeben und die Lösung 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde eine Lösung von 1.0 mg (0.83 U) β -1,4-Galactosyltransferase aus Kuhmilch (EC 2.4.1.22) in 100 μL 0.1 M HEPES-Puffer (pH 7.0) zugegeben und die Lösung weitere 2 Tage bei 37 °C inkubiert. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels analytischer HPLC (3→50 % B2 in 20 min, Säule 3) verfolgt. Das Reaktionsgemisch wurde auf eine Sep-Pak® C18-Säule (mit Wasser äquilibriert) gegeben. Nach Elution der Nebenprodukte mit Wasser, wurde das Produkt mit Methanol eluiert. Das Methanol der Produktfraktion wurde unter vermindertem Druck bei Raumtemperatur entfernt und die verbliebene wässrige Lösung lyophilisiert. Es wurden 10.8 mg (93 %) (*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)-*N*-acetyl- β -D-lactosaminid (**28**) als farbloser Schaum erhalten.

R_f: 0.73 (Dichlormethan/Methanol/Wasser, 6:4:1, v/v).

HPLC: $t_R = 10.8 \text{ min}$ (3→50 % B2 in 20 min, Säule 3).

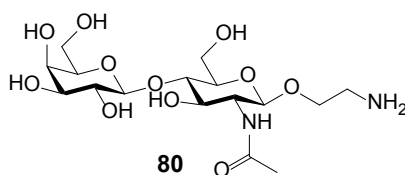
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): $\delta = 1.96$ (s, 3 H, CH_3), 3.24 – 3.36 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-NHCbz}$), 3.50 – 3.59 (m, 2 H, 5-CH, 2'-CH), 3.62 – 3.82 (m, 9 H, 2-CH, 3-CH, 4-CH, 6- CH_{2a} , 3'-CH, 5'-CH, 6'- CH_2 , $\text{CH}_{2a}\text{-CH}_2$).

NHCbz), 3.88 (m, 1 H, $\text{CH}_{2b}\text{-CH}_2\text{-NHCbz}$), 3.92 (d, $^3J = 3.2$ Hz, 1 H, 4'-CH), 3.95 (br d, $^2J = 11.9$ Hz, 1 H, 6- CH_{2b}), 4.45 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, 1'-CH), 4.51 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, 1-CH), 5.06 – 5.17 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 7.35 – 7.50 (m, 5 H, Ph-H_5).

^{13}C -NMR (126 MHz, D_2O): $\delta = 22.07$ (CH_3), 40.32 ($\text{CH}_2\text{-NHCbz}$), 55.00 (2-CH), 60.01 (6- CH_2), 61.00 (6'- CH_2), 66.91 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 68.52 (4'-CH), 68.68 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NHCbz}$), 70.94 (2'-CH), 74.72 (5-CH), 72.33, 72.49, 75.33, 78.37 (3-CH, 4-CH, 3'-CH, 5'-CH), 101.15 (1-CH), 102.86 (1'-CH), 127.78, 128.40, 128.78 (2x *o*-CH, 2x *m*-CH, *p*-CH), 136.41 (C_q^{Ph}), 158.32 ($(\text{C}_q=\text{O})^{\text{Cbz}}$), 174.57 (C_q^{Ac}).

m/z (HR-ESI-FT-ICR-MS): 561.2295 (ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_{13}^+$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 561.2290).

6.2.3.10 (2-Aminoethyl)-*N*-acetyl- β -D-lactosaminid (**80**)



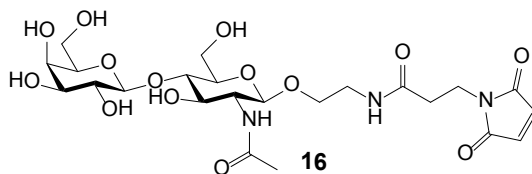
Unter Wasserstoff-Atmosphäre wurde eine Suspension von 7.3 mg (13.0 mmol) (*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)-*N*-acetyl- β -D-lactosaminid (**28**) und 8.0 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %) in 1 mL trockenem, entgastem Methanol 3 Stunden gerührt. Die Suspension wurde zunächst über Celite® 545 und dann einen Spritzenfilter (45 μm) filtriert. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde unter vermindertem Druck bei Raumtemperatur entfernt. Es wurden 5.4 mg (98 %) (2-Aminoethyl)-*N*-acetyl- β -D-lactosaminid (**80**) als farbloser Film erhalten.

R_f : 0.04 (Dichlormethan/Methanol/Wasser, 6:4:1, v/v).

^1H -NMR (300 MHz, D_2O): $\delta = 2.03$ (s, 3 H, CH_3), 3.02 – 3.22 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-NH}_2$), 3.52 (dd, $^3J = 10.0$ Hz, $^3J = 7.6$ Hz, 1 H, 2'-CH), 3.56 – 3.87 (m, 10 H, 2-CH, 3-CH, 4-CH, 5-CH, 6- CH_{2a} , 3'-CH, 5'-CH, 6'- CH_2 , $\text{CH}_{2a}\text{-CH}_2\text{-NH}_2$), 3.91 (d, $^3J = 3.9$ Hz, 1 H, 4'-CH), 3.94 – 4.05 (m, 2 H, 6- CH_{2b} , $\text{CH}_{2b}\text{-CH}_2\text{-NH}_2$), 4.46 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1 H, 1'-CH), 4.55 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, 1-CH).

m/z (HR-ESI-FT-ICR-MS): 427.1911 (ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_{11}^+$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 427.1922).

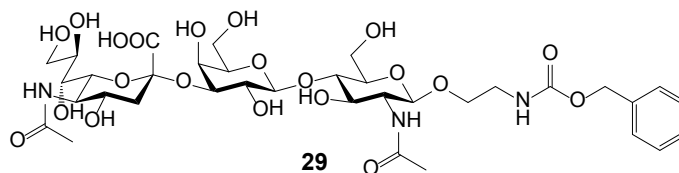
6.2.3.11 (*N*-(3'-Maleimidopropanoyl)-2-aminoethyl)-*N*-acetyl- β -D-lactosaminid (**16**)



Zu einem Gemisch aus 25.0 μL (2.50 μmol , 1.0 \AA q, 0.1 M in Wasser) (2-Aminoethyl)-*N*-acetyl- β -D-lactosaminid (**80**) und 25.0 μL (2.50 μmol , 1.0 \AA q, 0.1 M in Dioxan) *N*-Succinimidyl-3-maleimido-propionat (**81**)^[164-165] wurden 25.0 μL (2.50 μmol , 1.0 \AA q, 0.1 M in Wasser) Natriumhydrogen-

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 2.01 (s, 3 H, CH₃), 2.50 (t, ³J = 6.5 Hz, 2 H, C_q-CH₂-CH₂-N), 3.30 (t, ³J = 5.2 Hz, 2 H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.52 (dd, ³J = 9.6 Hz, ³J = 8.2 Hz, 1 H, 2'-CH), 3.55 – 3.60 (m, 1 H, 5-CH), 3.62 – 3.75 (m, 8 H, 2-CH, 3-CH, 4-CH, 3'-CH, 5'-CH, 6'-CH₂, O-CH_{2a}-CH₂-NH), 3.78 (t, ³J = 6.3 Hz, 2 H, C_q-CH₂-CH₂-N), 3.80 – 3.88 (m, 2 H, 6-CH_{2a}, O-CH_{2b}-CH₂-NH), 3.91 (d, ³J = 3.2 Hz, 1 H, 4'-CH), 3.97 (dd, *J* = 12.4 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1 H, 6-CH_{2b}), 4.46 (d, ³J = 7.8 Hz, 1 H, 1'-CH), 4.51 (d, ³J = 7.5 Hz, 1 H, 1-CH), 6.85 (s, 2 H, CH=CH).

6.2.3.12 (N-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)- α -sialyl-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)-N-acetyl- β -D-glucosaminid (29)



111

vermindertem Druck bei Raumtemperatur entfernt, die verbliebene wässrige Lösung lyophilisiert und der erhaltene Rückstand mittels semi-präparativer HPLC (3→30 % B1 in 30 min, Säule 7) gereinigt. Das Acetonitril der Produktfraktion wurde unter vermindertem Druck bei Raumtemperatur entfernt und die verbliebene wässrige Lösung auf eine Sep-Pak® C18-Säule (mit Wasser äquilibriert) gegeben. Die Säule wurde mit 3 mL Wasser gespült und das Produkt mit Methanol eluiert. Das Methanol der Produktfraktion wurde unter vermindertem Druck bei Raumtemperatur entfernt und die verbliebene wässrige Lösung lyophilisiert. Es wurden 3.8 mg (45 %) (*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)- α -sialyl-(2→3)- β -D-galactosyl-(1→4)-*N*-acetyl- β -D-glucosaminid (**29**) als farbloser Schaum erhalten.

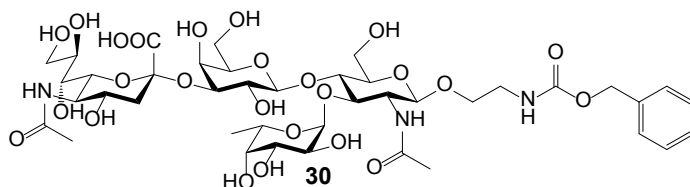
HPLC: t_R = 13.0 min (3→50 % B2 in 20 min, Säule 3).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ = 1.80 (t(dd), 2J = 12.1 Hz, 3J = 12.1 Hz, 1 H, 3''-CH_{2ax}), 1.97 (s, 3 H, CH₃²-NHAc), 2.04 (s, 3 H, CH₃^{5''}-NHAc), 2.76 (dd, 2J = 12.3 Hz, 3J = 4.3 Hz, 1 H, 3''-CH_{2eq}), 3.26 – 3.38 (m, 2 H, CH₂-NHCbz), 3.57 (dd, 3J = 9.9 Hz, 3J = 8.0 Hz, 1 H, 2'-CH), 3.54 – 3.78 (m, 12 H, 2-CH, 3-CH, 4-CH, 5'-CH, 6'-CH₂, 4''-CH, 6''-CH, 7''-CH, 8''-CH, 9''-CH_{2a}, CH_{2a}-CH₂-NHCbz), 3.82 (dd, 2J = 12.2 Hz, 3J = 5.0 Hz, 1 H, 6-CH_{2a}), 4.83 – 3.92 (m, 4 H, 5'-CH, 5''-CH, 9''-CH_{2b}, CH_{2b}-CH₂-NHCbz), 3.96 (d, 3J = 3.0 Hz, 1 H, 4'-CH), 3.98 (br d, 2J = 12.1 Hz, 1 H, 6-CH_{2b}), 4.12 (dd, 3J = 9.9 Hz, 3J = 3.1 Hz, 1 H, 3'-CH), 4.51 (d, 3J = 7.9 Hz, 1 H, 1-CH), 4.54 (d, 3J = 7.8 Hz, 1 H, 1'-CH), 5.07 – 5.20 (m, 2 H, CH₂-Ph), 7.36 – 7.52 (m, 5 H, Ph-H₅).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O): δ = 22.06, 22.11 (2x CH₃), 39.66 (3''-CH₂), 40.38 (CH₂-NHCbz), 51.71 (5''-CH), 55.03 (2-CH), 60.05 (6-CH₂), 61.04 (6'-CH₂), 62.61 (9''-CH₂), 66.94 (CH₂-Ph), 67.50 (4'-CH), 68.72 (CH₂-CH₂-NHCbz), 69.40 (2'-CH), 71.78 (5-CH), 75.51 (3'-CH), 68.13, 68.36, 72.33, 72.91, 74.77, 75.19, 78.31 (3-CH, 4-CH, 5'-CH, 4''-CH, 6''-CH, 7''-CH, 8''-CH), 99.84 (2''-C_q), 101.24 (1-CH), 102.60 (1'-CH), 127.82, 128.43, 128.82 (2x *o*-CH, 2x *m*-CH, *p*-CH), 136.44 (C_q^{Ph}), 158.34 ((C_q=O)^{Cbz}), 173.88, 174.59, 175.05 (1''-C_q, 2x C_q^{Ac}).

m/z (HR-ESI-FT-ICR-MS): 850.3099 (ber. für C₃₅H₅₂N₃O₂₁⁻ [M - H]⁻: 850.3099).

6.2.3.13 (*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)- α -sialyl-(2→3)- β -D-galactosyl-(1→4)-[α -L-fucosyl-(1→3)]-*N*-acetyl- β -D-glucosaminid (**30**)



Zu 794 μL 0.1 M Tris-Puffer (pH 7.5) wurden 50.0 μL (0.5 μmol , 0.2 M in Wasser) Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat, 100.0 μL (5.0 μmol , 50 mM in Wasser) (*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)- α -sialyl-(2→3)- β -D-galactosyl-(1→4)-*N*-acetyl- β -D-glucosaminid (**29**) und 18.2 mg Guano-

sin-5'-diphospho- β -L-fucose-Monoammoniumsalz (**35**), das mit Guanosin-5'-monophosphat und Diguanosintriphosphat verunreinigt war, gegeben. Anschließend wurde eine Lösung von 0.40 mg (4 U) alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (EC 3.1.3.1) in 50.0 μ L 0.1 M Tris-Puffer (pH 7.5) zugegeben und die Lösung 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 5.59 μ L (200 mU) α -1,3-Fucosyltransferase von *Helicobacter pylori*^[99] (EC 2.4.1.152) zugegeben und die Lösung 1 Tag bei 37 °C inkubiert. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels analytischer HPLC (3 \rightarrow 50 % B2 in 20 min, Säule 3) verfolgt. Das Reaktionsgemisch wurde auf eine Sep-Pak® C18-Säule (mit Wasser äquilibriert) gegeben. Nach Elution der Nebenprodukte mit Wasser, wurde das Rohprodukt mit Methanol eluiert. Das Methanol der Produktfraktion wurde unter vermindertem Druck bei Raumtemperatur entfernt, die verbliebene wässrige Lösung lyophilisiert und der erhaltene Rückstand mittels semi-präparativer HPLC (3 \rightarrow 30 % B1 in 30 min, Säule 8) gereinigt. Das Acetonitril der Produktfraktion wurde unter vermindertem Druck bei Raumtemperatur entfernt und die verbliebene wässrige Lösung auf eine Sep-Pak® C18-Säule (mit Wasser äquilibriert) gegeben. Die Säule wurde mit 3 mL Wasser gespült und das Produkt mit Methanol eluiert. Das Methanol der Produktfraktion wurde unter vermindertem Druck bei Raumtemperatur entfernt und die verbliebene wässrige Lösung lyophilisiert. Es wurden 2.2 mg (88 %) (*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)- α -sialyl-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)- [α -L-fucosyl-(1 \rightarrow 3)]- *N*-acetyl- β -D-glucosaminid (**30**) als farbloser Schaum erhalten.

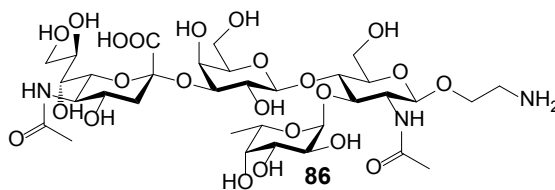
HPLC: t_R = 11.9 min (3 \rightarrow 50 % B2 in 20 min, Säule 3).

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 1.19 (d, ³*J* = 6.7 Hz, 3 H, 6'''-CH₃), 1.84 (t(dd), ²*J* = 12.2 Hz, ³*J* = 12.2 Hz, 1 H, 3''-CH_{2ax}), 1.98 (s, 3 H, CH₃²-NHAc), 2.06 (s, 3 H, CH₃^{5''}-NHAc), 2.79 (dd, ²*J* = 12.5 Hz, ³*J* = 4.6 Hz, 1 H, 3''-CH_{2eq}), 3.30 – 3.38 (m, 2 H, CH₂-NHCbz), 3.55 (dd, ³*J* = 9.8 Hz, ³*J* = 7.9 Hz, 1 H, 2'-CH), 3.56 – 3.97 (m, 19 H, 2-CH, 3-CH, 4-CH, 5-CH, 6-CH_{2a}, 5'-CH, 6'-CH₂, 4''-CH, 5''-CH, 6''-CH, 7''-CH, 8''-CH, 9''-CH₂, 2'''-CH, 3'''-CH, CH₂-CH₂-NHCbz), 3.80 (br d, ³*J* = 3.1 Hz, 1 H, 4'''-CH), 3.96 (d, ²*J* = 3.5 Hz, 1 H, 4'-CH), 4.01 (br d, ²*J* = 10.9 Hz, 1 H, 6-CH_{2b}), 4.12 (dd, ³*J* = 9.8 Hz, ³*J* = 3.2 Hz, 1 H, 3'-CH), 4.53 (d, ³*J* = 7.8 Hz, 1 H, 1'-CH), 4.53 – 4.57 (m, 1 H, 1-CH), 4.83 – 4.85 (m, 1 H, 5'''-CH), 5.11 (d, ³*J* = 4.0 Hz, 1 H, 1'''-CH), 5.12 – 5.19 (m, 2 H, CH₂-Ph), 7.40 – 7.51 (m, 5 H, Ph-H₅).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 15.27 (6'''-CH₃), 22.05, 22.15 (2x CH₃^{Ac}), 39.69 (3''-CH₂), 40.38 (CH₂-NHCbz), 51.71 (5''-CH), 55.74 (2-CH), 59.67 (6-CH₂), 61.45 (6'-CH₂), 62.68 (9''-CH₂), 66.68 (5'''-CH), 66.94 (CH₂-Ph), 67.30 (4'-CH), 71.91 (4'''-CH), 67.72, 68.17, 68.77, 69.21, 69.27, 71.71, 72.98, 73.34, 74.77, 74.88, 75.28 (3-CH, 4-CH, 5-CH, 2'-CH, 5'-CH, 4''-CH, 6''-CH, 7''-CH, 8''-CH, 2'''-CH, 3'''-CH, CH₂-CH₂-NHCbz), 75.66 (3'-CH), 98.58 (1'''-CH), 99.44 (2''-C_q), 101.06 (1-CH), 101.62 (1'-CH), 127.84, 128.43, 128.81 (2x *o*-CH, 2x *m*-CH, *p*-CH), 136.42 (C_q^{Ph}), 158.34 ((C_q=O)^{Cbz}), 173.50, 174.35, 175.04 (1''-C_q, 2x C_q^{Ac}).

m/z (HR-ESI-FT-ICR-MS): 996.3677 (ber. für C₄₁H₆₂N₃O₂₅⁻ [M - H]⁻: 996.3678).

6.2.3.14 (2-Aminoethyl)- α -sialyl-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -L-fucosyl-(1 \rightarrow 3)]-N-acetyl- β -D-glucosaminid (**86**)



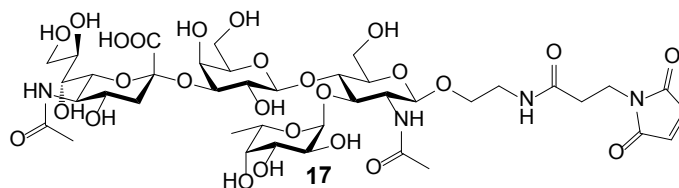
Unter Wasserstoff-Atmosphäre wurde eine Suspension von 5.0 mg (5.0 μ mol) (*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)- α -sialyl-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)- [α -L-fucosyl-(1 \rightarrow 3)]- *N*-acetyl- β -D-glucosaminid (**30**) und 25.0 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %) in 3 mL trockenen, entgasten Methanol 2 Stunden gerührt. Die Suspension wurde zunächst über Celite® 545 und dann einen Spritzenfilter (45 μ m) filtriert. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingeeengt und der Rückstand aus Wasser lyophilisiert. Es wurden 4.3 mg (quantitativ) (2-Aminoethyl)- α -sialyl-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -L-fucosyl-(1 \rightarrow 3)]-*N*-acetyl- β -D-glucosaminid (**86**) als farbloser Schaum erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ = 1.18 (d, 3J = 6.6 Hz, 3 H, 6'''- CH_3), 1.81 (t(dd), 2J = 12.2 Hz, 3J = 12.2 Hz, 1 H, 3''- $\text{CH}_{2\text{ax}}$), 2.05 (s, 6 H, 2x CH_3^{Ac}), 2.78 (dd, 2J = 12.5 Hz, 3J = 4.6 Hz, 1 H, 3''- $\text{CH}_{2\text{eq}}$), 3.01 – 3.12 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-NH}_2$), 3.54 (dd, 3J = 9.8 Hz, 3J = 7.8 Hz, 1 H, 2'-CH), 3.79 (d, 3J = 3.2 Hz, 1 H, 4'''-CH), 3.57 – 4.01 (m, 20 H, 3-CH, 4-CH, 5-CH, 6- $\text{CH}_{2\text{a}}$, 2'-CH, 4'-CH, 5'-CH, 6'- CH_2 , 4''-CH, 5''-CH, 6''-CH, 7''-CH, 8''-CH, 9''- CH_2 , 2'''-CH, 3'''-CH, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$), 4.03 (dd, 2J = 12.2 Hz, 3J = 2.0 Hz, 1 H, 6- $\text{CH}_{2\text{b}}$), 4.10 (dd, 3J = 9.8 Hz, 3J = 3.1 Hz, 1 H, 3'-CH), 4.54 (d, 3J = 7.8 Hz, 1 H, 1'-CH), 4.58 (d, 3J = 8.4 Hz, 1 H, 1-CH), 4.83 – 4.85 (m, 1 H, 5'''-CH), 5.12 (d, 3J = 3.9 Hz, 1 H, 1'''-CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O): δ = 15.29 (6'''- CH_3), 22.05, 22.23 (2x CH_3^{Ac}), 39.68 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$), 39.83 (3''- CH_2), 51.72 (5''-CH), 55.70 (2-CH), 59.62 (6- CH_2), 61.51 (6'- CH_2), 62.64 (9''- CH_2), 66.72 (5'''-CH), 67.34, 67.70, 68.15, 68.29, 69.21, 69.26, 71.90, 72.95, 73.28, 74.80, 74.97, 75.25 (3-CH, 4-CH, 5-CH, 2'-CH, 4'-CH, 5'-CH, 4''-CH, 6''-CH, 7''-CH, 8''-CH, 2'''-CH, 3'''-CH, 4'''-CH, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$), 75.71 (3'-CH), 98.63 (1'''-CH), 99.69 (2''- C_q), 100.94 (1-CH), 101.66 (1'-CH), 173.85, 174.55, 175.08 (1''- C_q , 2x C_q^{Ac}).

m/z (HR-ESI-FT-ICR-MS): 862.3311 (ber. für $\text{C}_{33}\text{H}_{56}\text{N}_3\text{O}_{23}^-$ [$\text{M} - \text{H}$]: 862.3310).

6.2.3.15 (N-(3'-Maleimidopropanoyl)-2-aminoethyl)- α -sialyl-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -L-fucosyl-(1 \rightarrow 3)]-N-acetyl- β -D-glucosaminid (17**)**

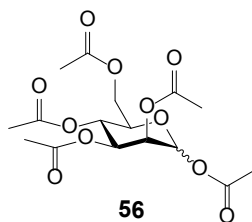


Zu einem Gemisch aus 80.0 μ L (2.0 μ mol, 1 Äq, 25 mM in Wasser) (2-Aminoethyl)- α -sialyl-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -L-fucosyl-(1 \rightarrow 3)]-N-acetyl- β -D-glucosaminid (**86**) und 820 μ L 0.1 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer (pH 6.5) wurden 100.0 μ L (10.0 μ mol, 5 Äq, 0.1 M in Dioxan) *N*-Succinimidyl-3-maleimidopropionat (**81**)^[164-165] gegeben und dieses 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Dioxan des Reaktionsgemischs wurde unter vermindertem Druck entfernt und die verbliebene wässrige Lösung mittels semi-präparativer HPLC (0 \rightarrow 10 % B1 in 30 min, Säule 8) gereinigt. Das Acetonitril der Produktfraktion wurde unter vermindertem Druck entfernt und die verbliebene wässrige Lösung auf eine Sep-Pak® C18-Säule (mit Wasser äquilibriert) gegeben. Die Säule wurde mit 3 mL Wasser gespült und das Produkt mit Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (1:1:4 \cdot 10⁻⁶, v/v) eluiert. Das Acetonitril der Produktfraktion wurde unter vermindertem Druck entfernt und die verbliebene wässrige Lösung lyophilisiert. Es wurden 0.91 mg (45 %) (N-(3'-Maleimidopropanoyl)- 2-aminoethyl)- α -sialyl-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -L-fucosyl-(1 \rightarrow 3)]-N-acetyl- β -D-glucosaminid (**17**) als farbloser Schaum erhalten.

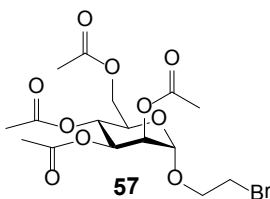
HPLC: t_R = 10.3 min (0 \rightarrow 10 % B1 in 30 min, Säule 8).

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 1.15 (d, ³ J = 6.6 Hz, 3 H, 6'''-CH₃), 1.79 (t(dd), ² J = 12.2 Hz, ³ J = 12.2 Hz, 1 H, 3'''-CH_{2ax}), 2.00 (s, 3 H, CH₃^{Ac}), 2.02 (s, 3 H, CH₃^{Ac}), 2.50 (t, ³ J = 6.5 Hz, 2 H, C_q-CH₂-CH₂-N), 2.75 (dd, ² J = 12.4 Hz, ³ J = 4.6 Hz, 1 H, 3''-CH_{2eq}), 3.29 (m_c, 2 H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.52 (dd, ³ J = 9.8 Hz, ³ J = 7.9 Hz, 1 H, 2'-CH), 3.55 – 3.96 (m, 23 H, 2-CH, 3-CH, 4-CH, 5-CH, 6-CH_{2a}, 4'-CH, 5'-CH, 6'-CH₂, 4''-CH, 5''-CH, 6''-CH, 7''-CH, 8''-CH, 9''-CH₂, 2'''-CH, 3'''-CH, 4'''-CH, O-CH₂-CH₂-NH, C_q-CH₂-CH₂-N), 4.00 (dd, ² J = 12.1 Hz, ³ J = 2.0 Hz, 1 H, 6-CH_{2b}), 4.08 (dd, ³ J = 9.8 Hz, ³ J = 3.1 Hz, 1 H, 3'-CH), 4.51 (d, ³ J = 7.8 Hz, 1 H, 1'-CH), 4.52 (d, ³ J = 8.2 Hz, 1 H, 1-CH), 4.81 – 4.82 (m, 1 H, 5'''-CH), 5.08 (d, ³ J = 3.9 Hz, 1 H, 1'''-CH), 6.86 (s, 2 H, CH=CH).

m/z (HR-ESI-FT-ICR-MS): 1013.3583 (ber. für C₄₀H₆₁N₄O₂₆⁻ [M - H]⁻: 1013.3580).

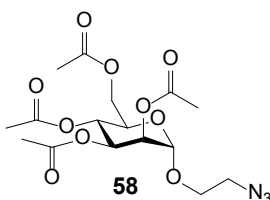
6.2.3.16 Pentaacetyl-D-mannose (56)

Die Synthese wurde analog einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift.^[166] Ausgehend von 5.00 g (27.75 mmol) D-Mannose (**31**) wurden 10.83 g (quantitativ) Pentaacetyl-D-mannose ($\alpha:\beta = 7:3$) (**56**) als farbloses Öl erhalten. Die NMR-spektroskopischen Daten waren in Übereinstimmung mit der Literatur.^[167]

6.2.3.17 (2-Bromethyl)-2,3,4,5-tetraacetyl- α -D-mannosid (57)

Die Synthese wurde analog einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift^[100] durchgeführt. Abweichend davon betrug die Reaktionszeit 18 Stunden. Außerdem wurde die chromatographische Reinigung mit Cyclohexan/Essigsäureethylester (2:1→1:1, v/v) durchgeführt. Ausgehend von 8.00 g (20.50 mmol) Pentaacetyl-D-Mannose (**56**) wurden 1.18 g (13 %) (2-Bromethyl)-2,3,4,5-tetraacetyl- α -D-mannosid (**57**) als farbloser Schaum erhalten. Die NMR-spektroskopischen Daten waren in Übereinstimmung mit der Literatur.^[100]

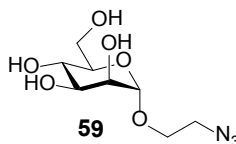
R_f: 0.26 (Cyclohexan/Essigsäureethylester, 1:1, v/v).

6.2.3.18 (2-Azidoethyl)-2,3,4,5-tetraacetyl- α -D-mannosid (58)

Die Synthese wurde analog einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift^[101] durchgeführt. Abweichend davon betrug die Reaktionszeit 17 Stunden. Außerdem wurde die chromatographische Reinigung mit Cyclohexan/Essigsäureethylester (1:1, v/v) durchgeführt. Ausgehend von 1.00 g

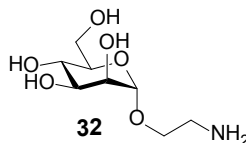
(2.20 mmol) (2-Bromethyl)-2,3,4,5-Tetraacetyl- α -D-mannosid (**57**) wurden 698 mg (76 %) (2-Azidoethyl)-2,3,4,5-tetraacetyl- α -D-mannosid (**58**) als farbloser Schaum erhalten. Die NMR-spektroskopischen Daten waren in Übereinstimmung mit der Literatur.^[101]

6.2.3.19 (2-Azidoethyl)- α -D-mannosid (**59**)



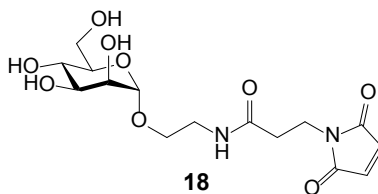
Die Synthese wurde analog einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift^[101] durchgeführt. Ausgehend von 626 mg (1.50 mmol) (2-Azidoethyl)-2,3,4,5-tetraacetyl- α -D-mannosid (**58**) wurden 377 mg (quantitativ) (2-Azidoethyl)- α -D-mannosid (**59**) erhalten. Die NMR-spektroskopischen Daten waren in Übereinstimmung mit der Literatur.^[101]

6.2.3.20 (2-Aminoethyl)- α -D-mannosid (**32**)



Die Synthese wurde analog einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift^[101] durchgeführt. Ausgehend von 310 mg (1.24 mmol) (2-Azidoethyl)- α -D-mannosid (**59**) wurden 179 mg (64 %) (2-Aminoethyl)- α -D-mannosid (**32**) erhalten. Die NMR-spektroskopischen Daten waren in Übereinstimmung mit der Literatur.^[101]

6.2.3.21 (N-(3'-Maleimidopropionyl)-2-aminoethyl)- α -D-mannosid (**18**)



Zu einem Gemisch aus 1344 μ L (134.4 μ mol, 1.0 Äq, 0.1 M in Wasser) (2-Aminoethyl)- α -D-mannosid (**32**) und 2016 μ L (201.6 μ mol, 1.5 Äq, 0.1 M in Dioxan) *N*-Succinimidyl-3-maleimido-propionat (**81**)^[164-165] wurden 1344 μ L (134.4 μ mol, 1.0 Äq, 0.1 M in Wasser) Natriumhydrogencarbonat gegeben und dieses 1 Tag geschüttelt. Das Dioxan im Reaktionsgemisch wurde unter vermindertem Druck bei Raumtemperatur entfernt, die verbliebene wässrige Lösung lyophilisiert und der erhaltene Rückstand mittels präparativer HPLC (0→20 % B1 in 30 min, Säule 9)

gereinigt. Das Acetonitril der Produktfraktion wurde unter vermindertem Druck bei Raumtemperatur entfernt und die verbliebene wässrige Lösung lyophilisiert. Es wurden 29.5 mg (59 %) (*N*-(3'-Maleimidopropanoyl)-2-aminoethyl)- α -D-mannosid (**18**) als farbloser Feststoff erhalten.

HPLC: t_R = 13.3 min (0→20 % B1 in 30 min, Säule 9).

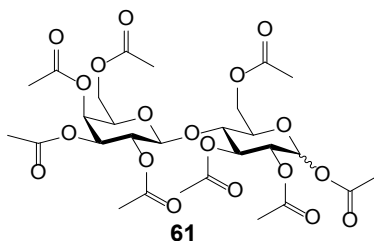
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ = 2.54 (t, 3J = 6.5 Hz, 2 H, $\text{C}_q\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 3.32 (ddd, 2J = 14.4 Hz, 3J = 6.7 Hz, 3J = 4.0 Hz, 1 H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_{2a}\text{-NH}$), 3.42 (ddd, 2J = 14.4 Hz, 3J = 6.6 Hz, 3J = 3.9 Hz, 1 H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_{2b}\text{-NH}$), 3.55 (ddd, 2J = 10.6 Hz, 3J = 6.8 Hz, 3J = 3.9 Hz, 1 H, $\text{O-CH}_{2a}\text{-CH}_2\text{-NH}$), 3.58 – 3.63 (m, 1 H, 5-CH), 3.65 (t(dd), 3J = 9.5 Hz, 1 H, 4-CH), 3.71 – 3.83 (m, 5 H, 3-CH, 6- CH_{2a} , $\text{O-CH}_{2b}\text{-CH}_2\text{-NH}$, $\text{C}_q\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 3.88 (dd, 2J = 12.2 Hz, 3J = 2.0 Hz, 1H, 6- CH_{2b}), 3.93 (dd, 3J = 3.3 Hz, 3J = 1.7 Hz, m, 1 H, 2-CH), 4.85 (d, 3J = 1.5 Hz, 1 H, 1-CH), 6.88 (s, 2 H, CH=CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O): δ = 34.46, 34.64 ($\text{C}_q\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 38.97 ($\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 60.88 (6- CH_2), 65.70 ($\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 66.70 (4-CH), 69.98 (2-CH), 70.48 (3-CH), 72.80 (5-CH), 99.65 (1-CH), 134.46 (CH=CH), 172.59, 173.63 (NH-C_q , $\text{C}_q\text{-CH=CH-C}_q$).

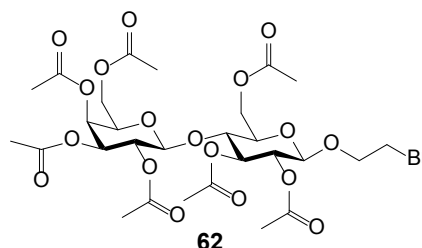
m/z (HR-ESI-FT-ICR-MS): 397.1215 (ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{NaO}_9^+$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 397.1218).

6.2.4 Fluorescein-markierte Lactose

6.2.4.1 Octaacetyl-D-lactose (61)

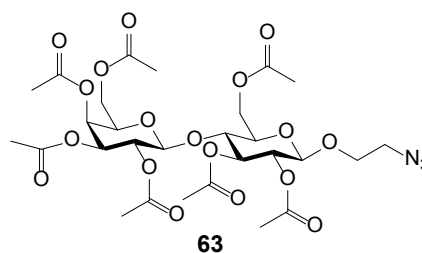


Die Synthese wurde analog einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift.^[166] Ausgehend von 5.00 g (13.88 mmol) D-Lactose-Monohydrat (**60**) wurden 9.35 g (99 %) Octaacetyl-D-lactose ($\alpha:\beta$ = 1:4) (**61**) als farbloser Schaum erhalten. Die NMR-spektroskopischen Daten waren in Übereinstimmung mit der Literatur.^[168]

6.2.4.2 2,3,5,2',3',4',5'-Heptaacetyl-(2-bromethyl)- β -D-lactosid (62)

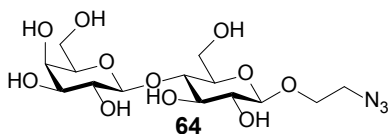
Die Synthese wurde analog einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift^[100] durchgeführt. Abweichend davon betrug die Reaktionszeit 3 Tage. Außerdem wurde die chromatographische Reinigung mit Cyclohexan/Essigsäureethylester (4:1→2:3, v/v) durchgeführt. Ausgehend von 4.00 g (5.90 mmol) Octaacetyl-D-lactose (**61**) wurden 0.73 g (17 %) 2,3,5,2',3',4',5'-Heptaacetyl-(2-bromomethyl)- β -D-lactosid (**62**) als farbloser Schaum erhalten. Die NMR-spektroskopischen Daten waren in Übereinstimmung mit der Literatur.^[169]

R_f: 0.70 (Cyclohexan/Essigsäureethylester, 4:1, v/v).

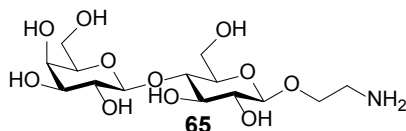
6.2.4.3 2,3,5,2',3',4',5'-Heptaacetyl-(2-azidoethyl)- β -D-lactosid (63)

Die Synthese wurde analog einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift^[101] durchgeführt. Abweichend davon betrug die Reaktionszeit 16 Stunden. Außerdem wurde die chromatographische Reinigung mit Cyclohexan/Essigsäureethylester (1:1, v/v) durchgeführt. Ausgehend von 0.50 g (0.67 mmol) 2,3,5,2',3',4',5'-Heptaacetyl-(2-bromomethyl)- β -D-lactosid (**62**) wurden 430 mg (91 %) 2,3,5,2',3',4',5'-Heptaacetyl-(2-azidoethyl)- β -D-lactosid (**63**) als farbloser Schaum erhalten. Die NMR-spektroskopischen Daten waren in Übereinstimmung mit der Literatur.^[169]

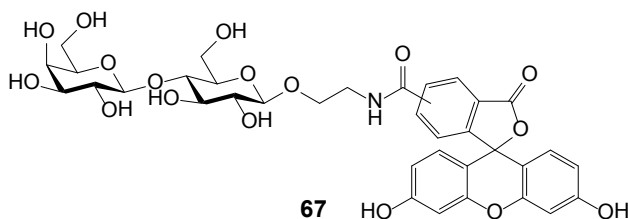
R_f: 0.70 (Cyclohexan/Essigsäureethylester, 4:1, v/v).

6.2.4.4 2-Azidoethyl- β -D-lactosid (**64**)

Die Synthese wurde analog einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift^[101] durchgeführt. Ausgehend von 395 mg (0.56 mmol) 2,3,5,2',3',4',5'-Heptaacetyl-(2-azidoethyl)- β -D-lactosid (**63**) wurden 187 mg (81 %) 2-Azidoethyl- β -D-lactosid (**64**) erhalten. Die NMR-spektroskopischen Daten waren in Übereinstimmung mit der Literatur.^[169]

6.2.4.5 2-Aminoethyl- β -D-lactosid (**65**)

Die Synthese wurde analog einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift^[101] durchgeführt. Ausgehend von 157 mg (381 μ mol) 2-Azido-ethyl- β -D-lactosid (**64**) wurden 82 mg (56 %) 2-Aminoethyl- β -D-lactosid (**65**) als farbloser Feststoff erhalten. Die NMR-spektroskopischen Daten waren in Übereinstimmung mit der Literatur.^[102]

6.2.4.6 (*N*-(5(6)-Carboxyfluoresceinoyl)-2-aminoethyl)- β -D-lactosid (**67**)

Unter Lichtausschluss wurde eine Lösung von 29.3 mg (77.0 μ mol, 1.2 Äq) 5(6)-Carboxyfluorescein (**66**), 11.2 mg (95.6 μ mol, 1.5 Äq) *N*-Hydroxysuccinimid und 15.0 μ L (95.6 μ mol, 1.5 Äq) *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid in 435 μ L *N,N*-Dimethylformamid 5 Stunden bei 40 °C geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde zu einer Lösung von 25 mg (64.9 μ mol, 1.0 Äq) 2-Aminoethyl- β -D-lactosid (**65**) in 130 μ L (64.9 μ mol, 1.0 Äq) 0.5 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung gegeben. Nachdem 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Methanol aufgeschlämmt. Die erhaltene Suspension wurde filtriert, das Lösungsmittel des Filtrats unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol/Ameisensäure, 80:20:0.5,

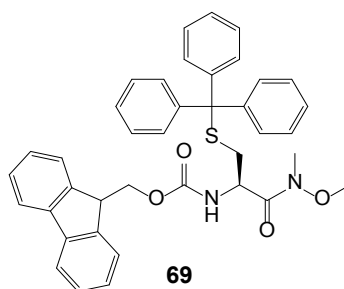
v/v) gereinigt. Es wurden 29 mg (60 %) (*N*-(5(6)-Carboxyfluoresceinoyl)-2-aminoethyl)- β -D-lactosid (**67**) als orangefarbener Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 3.00 (t(dd), 3J = 8.0 Hz, 0.5 H, 2'-CH), 3.06 (t(dd), 3J = 8.1 Hz, 0.5 H, 2'-CH), 3.22 – 3.94 (m, 15 H, 2-CH, 3-CH, 4-CH, 5-CH, 6-CH₂, 3'-CH, 4'-CH, 5'-CH, 6'-CH₂, CH₂-CH₂-NH-FAM), 4.16 – 4.22 (m, 1.5 H, 1-CH, 1'-CH), 4.28 (d, 3J = 7.9 Hz, 0.5 H, 1'-CH), 6.52 – 6.71 (m, 6 H, 1'''-CH^{FAM}, 2'''-CH^{FAM}, 4'''-CH^{FAM}, 5'''-CH^{FAM}, 7'''-CH, 8'''-CH^{FAM}), 7.37 (d, 3J = 8.0 Hz, 0.5 H, 7'''-CH^{5-FAM}), 7.67 (s, 0.5 H, 7'''-CH^{6-FAM}), 8.07 (d, 3J = 8.0 Hz, 0.5 H, 4'''-CH^{6-FAM}), 8.16 (dd, 3J = 8.1 Hz, 4J = 1.4 Hz, 0.5 H, 5'''-CH^{6-FAM}), 8.23 (dd, 3J = 8.1 Hz, 4J = 1.6 Hz, 0.5 H, 6'''-CH^{5-FAM}), 8.44 (s, 0.5 H, 4'''-CH^{5-FAM}), 8.70 (t, 3J = 5.2 Hz, 0.5 H, NH), 8.81 (t, 3J = 5.5 Hz, 0.5 H, NH), 10.14 (s, 2 H, 3'''-OH^{FAM}, 6'''-OH^{FAM}).

m/z (HR-ESI-FT-ICR-MS): 742.1988 (ber. für $\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{NO}_{17}^-$ [$\text{M} - \text{H}$]: 742.1989).

6.2.5 Rückgratmodifiziertes PNA-Monomer

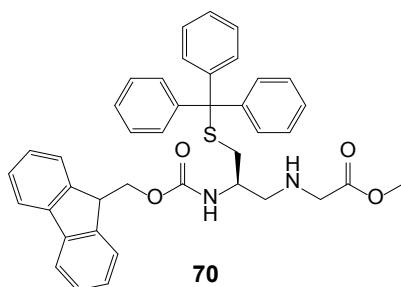
6.2.5.1 (*R*)-*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*S*-tritylcystein-weinrebamid (**69**)



Die Synthese basierte auf einer in der Literatur^[104] beschriebenen Vorschrift. Unter Argon-Atmosphäre wurde eine Lösung von 15.00 g (25.61 mmol, 1.0 Äq) (*R*)-*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*S*-tritylcystein (**68**) und 6.2 mL (56.34 mmol, 2.2 Äq) *N*-Methylmorpholin in 400 mL trockenen Dichlormethan auf -10 °C gekühlt. Innerhalb von 5 Minuten wurden 3.7 mL (28.17 mmol, 1.1 Äq) Chlorameisensäureisobutylester zugegeben. Nachdem 15 Minuten bei -10 °C gerührt wurde, wurden 2.50 g (25.61 mmol, 1.0 Äq) *N,O*-Dimethylhydroxylaminhydrochlorid zugegeben und 13 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 180 mL 0.2 M Kaliumhydrogensulfat-Lösung gewaschen und die wässrige Phase dreimal mit je 170 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt und der erhaltene Rückstand säulenchromatographisch (Cyclohexan/Essigsäureethylester, 3:1→2:1, v/v) gereinigt. Es wurden 11.29 g (70 %) (*R*)-*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*S*-tritylcystein-weinrebamid (**69**) als farbloser Schaum erhalten. Die NMR-spektroskopischen Daten waren in Übereinstimmung mit der Literatur.^[170]

R_f: 0.53 (Cyclohexan/Essigsäureethylester, 1:1, v/v).

6.2.5.2 (*R*)-*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-1-(*S*-tritylthiomethyl)-aminoethylglycinmethylester (**70**)



Die Synthese basierte auf in der Literatur^[104-105] beschriebenen Vorschriften. Unter Argon-Atmosphäre und bei -72 °C wurden 10.0 mL (34.99 mmol, 2.0 Äq, 3.5 M in Tetrahydrofuran/Toluol) Lithiumaluminiumhydrid-Lösung in 80 mL trockenen Tetrahydrofuran suspendiert. Innerhalb von 15 Minuten wurde eine Lösung von 11.00 g (17.50 mmol, 1.0 Äq) (*R*)-*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*S*-tritylcystein-weinrebamid (**69**) in 60 mL trockenen Tetrahydrofuran zugetropft. Nachdem 1 Stunde bei -72 °C gerührt wurde, wurden langsam 50 mL 0.2 M Kaliumhydrogensulfat-Lösung zugegeben und das Reaktionsgemisch fünfmal mit je 100 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 50 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und die erhaltene wässrige Phase mit 100 mL Diethylether reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei Raumtemperatur entfernt. Unter Argon-Atmosphäre wurde der erhaltene Rückstand in 140 mL trockenen Methanol/Tetrahydrofuran (1:3, v/v) suspendiert. Bei 5 °C wurden anschließend 6.59 g (52.49 mmol, 3.0 Äq) Glycinmethylesterhydrochlorid und 1.10 g (17.50 mmol, 1.0 Äq) Natriumcyanoborhydrid zugegeben. Nachdem 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde die Suspension unter vermindertem Druck bei 40 °C eingeengt und der erhaltene Rückstand in 800 mL Essigsäureethylester suspendiert. Die organische Phase wurde mit 100 mL Wasser und 100 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, wobei nach jedem Waschvorgang mit je 150 mL Essigsäureethylester reextrahiert wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt und der erhaltene Rückstand säulenchromatographisch (Cyclohexan/Essigsäureethylester, 2:1→1:1, v/v) gereinigt. Es wurden 4.37 g (39 %) (*R*)-*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-1-(*S*-tritylthiomethyl)-aminoethylglycinmethylester (**70**) als farbloser Schaum erhalten.

R_f: 0.16 (Cyclohexan/Essigsäureethylester, 1:1, v/v).

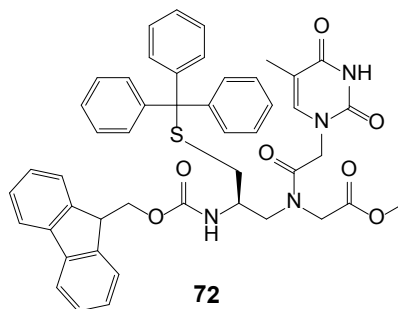
$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +10.7^\circ \text{ mL dm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ($c = 1.00 \text{ g mL}^{-1}$ in Ethanol).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ = 2.33 – 2.44 (m, 1 H, $\text{CH}_{2a}\text{-S}$), 2.44 – 2.58 (m, 2 H, $\text{CH}_{2b}\text{-S}$, 4- CH_{2a}), 2.64 – 2.78 (m, 1 H, 4- CH_{2b}), 3.26 – 3.44 (m, 2 H, 2- CH_2), 3.60 – 3.71 (m, 1 H, 5- CH), 3.71 (s, 3 H, CH_3), 4.22 (t, 3J = 6.8 Hz, 1 H, 9'- CH), 4.38 (d, 3J = 6.6 Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 5.13 (br d, 3J = 7.7 Hz, 1 H, NH), 7.16 – 7.46 (m, 19 H, 3x Ph- H_5 , 2'- CH , 3'- CH , 6'- CH , 7'- CH), 7.61 (d, 3J = 7.4 Hz, 2 H, 1'- CH , 8'- CH), 7.76 (br d, 3J = 7.6 Hz, 2 H, 4'- CH , 5'- CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ = 34.50 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 47.34 (9'- CH), 50.53, 51.57 (2- CH_2 , 4- CH_2), 51.99 (CH_3), 66.73, 64.03 (S- C_q , $\text{CH}_2\text{-O}$), 120.06 (4'- CH , 5'- CH), 125.27 (1'- CH , 8'- CH), 126.90 (3x $p\text{-CH}$), 127.16, 127.77 (2'- CH , 3'- CH , 6'- CH , 7'- CH), 128.09, 129.70 (6x $o\text{-CH}$, 6x $m\text{-CH}$), 141.41, 144.03, 144.10 (4x C_q^{Fmoc}), 144.65 (3x C_q^{Trt}), 156.01 (NH- $\text{C}_q=\text{O}$), 172.52 ($\text{CH}_2\text{-C}_q=\text{O}$).

m/z (HR-ESI-FT-ICR-MS): 643.2621 (ber. für $\text{C}_{40}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}^+$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 643.2625).

6.2.5.3 (*R*)-*N*-[*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-1-(*S*-tritylthiomethyl)-aminoethyl]-*N*-[(1-thyminy)-acetyl]-glycinmethylester (**72**)



Die Synthese basierte auf einer in der Literatur^[104] beschriebenen Vorschrift. Unter Argon-Atmosphäre und bei -10 °C wurden zu einer Suspension von 190.6 mg (1.04 mmol, 1.5 Äq) (1-Thyminy)-essigsäure (**71**)^[171] in 15 mL Acetonitril/*N,N*-Dimethylformamid (1:1, v/v) 455 μL (4.14 mmol, 6.0 Äq) *N*-Methylmorpholin und 191.0 μL (1.55 mmol, 2.25 Äq) Pivalinsäurechlorid gegeben. Nachdem 20 Minuten bei -10 °C gerührt wurde, wurde eine Lösung von 453.1 mg (0.69 mmol, 1.0 Äq) (*R*)-*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-1-(*S*-tritylthiomethyl)-aminoethylglycinmethylester (**70**) in 7.5 mL *N,N*-Dimethylformamid innerhalb von 5 Minuten zugetropft. Anschließend wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in 60 mL Essigsäureethylester gegeben und dreimal mit je 15 mL 0.1 M Salzsäure gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Cyclohexan/Essigsäureethylester, 4:1, v/v) gereinigt. Es wurden 252 mg (48 %) (*R*)-*N*-[*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-1-(*S*-tritylthiomethyl)-aminoethyl]-*N*-[(1-thyminy)-acetyl]-glycinmethylester (**72**) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f : 0.31 (Essigsäureethylester).

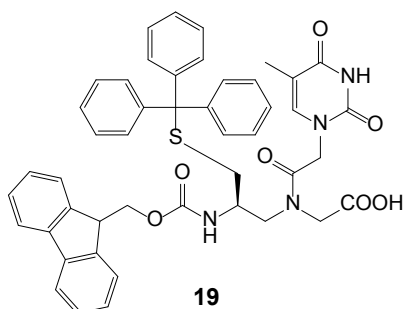
$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +7.3^\circ \text{ mL dm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ($c = 1.00 \text{ g mL}^{-1}$ in Ethanol).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = [2 Rotamere] 1.83 (s, 1.5 H, $\text{C}_q\text{-CH}_3$), 1.85 (s, 1.5 H, $\text{C}_q\text{-CH}_3$), 2.34 (dd, $^2J = 12.7$ Hz, $^3J = 4.8$ Hz, 0.5 H, $\text{CH}_{2a}\text{-S}$), 2.40 – 2.49 (m, 1 H, $\text{CH}_{2a}\text{-S}$, $\text{CH}_{2b}\text{-S}$), 2.71 (br d, $J = 8.3$ Hz, 0.5 H, $\text{CH}_{2b}\text{-S}$), 3.02 – 3.09 (m, 0.5 H, $4'\text{-CH}_{2a}$), 3.15 (br d, $J = 9.5$ Hz, 0.5 H, $4'\text{-CH}_{2a}$), 3.42 – 3.51 (m, 1 H, $4'\text{-CH}_{2b}$, $5'\text{-CH}$), 3.54 – 3.64 (m, 1 H, $4'\text{-CH}_{2b}$, $5'\text{-CH}$), 3.70 (s, 1.5 H, O-CH_3), 3.76 (s, 1.5 H, O-CH_3), 3.76 – 3.82 (m, 0.5 H, $2'\text{-CH}_{2a}$), 3.94 – 4.04 (m, 1.5 H, $2'\text{-CH}_{2a}$, $2'\text{-CH}_{2b}$), 4.16 – 4.46 (m, 4.5 H, $\text{CH}_{2a}\text{-Thymin}$, $\text{CH}_{2b}\text{-Thymin}$, $\text{CH}_2\text{-O}$, $9''\text{-CH}$), 4.56 (d, $^2J = 16.0$ Hz, 0.5 H, $\text{CH}_{2b}\text{-Thymin}$), 5.06 – 5.13 (m, 0.5 H, $6'\text{-NH}$), 5.44 (br s, 0.5 H, $6'\text{-NH}$), 6.84 (br s, 0.5 H, 6-CH), 6.87 (s, 0.5 H, 6-CH), 7.18 – 7.31 (m, 11 H, $2''\text{-CH}$, $7''\text{-CH}$, $6x\ m\text{-CH}$, $3x\ p\text{-CH}$), 7.34 – 7.38 (m, 2 H, $3''\text{-CH}$, $6''\text{-CH}$), 7.38 – 7.46 (m, 6 H, $6x\ o\text{-CH}$), 7.54 – 7.61 (m, 2 H, $1'\text{-CH}$, $8'\text{-CH}$), 7.71 – 7.76 (m, 2 H, $4'\text{-CH}$, $5'\text{-CH}$), 9.04 – 9.19 (m, 1 H, 3-NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ = [2 Rotamere] 12.39 ($\text{C}_q\text{-CH}_3$), 33.40, 34.36 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 47.24, 47.33 ($9''\text{-CH}$), 47.51, 47.72 ($\text{CH}_2\text{-thymine}$), 48.87, 49.58 ($2'\text{-CH}_2$), 49.50, 49.88 ($5'\text{-CH}$), 50.69, 50.94, ($4'\text{-CH}_2$), 52.45, 52.97 (O-CH_3), 66.70, 66.84 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 67.22, 67.63 (S-C_q), 110.63, 110.73 (5-C_q), 120.04, 120.11 ($4''\text{-CH}$, $5''\text{-CH}$), 125.12, 125.20, 125.34 ($1''\text{-CH}$, $8''\text{-CH}$), 126.95, 127.13, 127.23, 127.80, 127.88, 128.12, 128.23, 129.61, 129.66 ($2''\text{-CH}$, $3''\text{-CH}$, $6''\text{-CH}$, $7''\text{-CH}$, $3x\ o\text{-CH}$, $3x\ m\text{-CH}$), 140.92, 141.23 (6-CH), 141.34, 141.40, 143.82, 143.85, 144.19, 144.32, 144.48 ($4x\ \text{C}_q^{\text{Fmoc}}$, $3x\ \text{C}_q^{\text{Trit}}$), 150.99, 151.05 (2-C_q), 156.02, 156.11 ($\text{NH-(C}_q\text{=O)-O}$), 164.28, 164.32, 167.69, 168.41, 169.44, 169.49 (4-C_q , $1'\text{-C}_q$, $\text{C}_q\text{-CH}_2\text{-Thymin}$).

m/z (HR-ESI-FT-ICR-MS): 831.2815 (ber. für $\text{C}_{47}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{NaO}_7\text{S}^+$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 831.2823).

6.2.5.4 (R)-N-[N-Fluorenylmethoxycarbonyl-1-(S-tritylthiomethyl)-aminoethyl]-N-[(1-thyminyl)-acetyl]-glycin (19)



Bei 0 °C wurden 2.47 mL (1.24 mmol, 2.0 Äq) 0.5 M Lithiumhydroxid-Lösung langsam zu einer Lösung von 500 mg (0.62 mmol, 1.0 Äq) (R)-N-[N-Fluorenylmethoxycarbonyl-1-(S-tritylthiomethyl)-aminoethyl]-N-[(1-thyminyl)-acetyl]-glycinmethylester (**72**) in 6.2 mL Tetrahydrofuran gegeben. Nachdem 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde das Reaktionsgemisch mit 25 %iger Ameisensäure auf pH 3 – 4 angesäuert und dreimal mit je 20 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 5 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, wobei mit 10 mL Essigsäureethylester reextrahiert wurde. Die

vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol/Ameisensäure, 95:5:0.5, v/v) gereinigt. Es wurden 319 mg (65 %) (*R*)-*N*-[*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl]-1-(*S*-tritylthiomethyl)-aminoethyl-*N*-[(1-thyminyl)-acetyl]-glycin (**19**) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f : 0.30 (Dichlormethan/Methanol/Ameisensäure, 95:5:0.5, v/v).

HPLC: t_R = 16.8 min (30→90 % B2 in 20 min, Säule 2).

$[\alpha]_D^{24} = +6.5^\circ \text{ mL dm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ($c = 1.00 \text{ g mL}^{-1}$ in Ethanol).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ = [2 Rotamere] 1.78 (s, 1.5 H, $\text{C}_q\text{-CH}_3$), 1.79 (s, 1.5 H, $\text{C}_q\text{-CH}_3$), 2.23 (dd, $^2J = 12.9 \text{ Hz}$, $^3J = 4.9 \text{ Hz}$, 0.5 H, $\text{CH}_{2a}\text{-S}$), 2.28 (dd, $^2J = 13.0 \text{ Hz}$, $^3J = 4.6 \text{ Hz}$, 0.5 H, $\text{CH}_{2a}\text{-S}$), 2.43 (dd, $^2J = 12.8 \text{ Hz}$, $^3J = 8.8 \text{ Hz}$, 0.5 H, $\text{CH}_{2b}\text{-S}$), 2.61 (dd, $^2J = 12.9 \text{ Hz}$, $^3J = 8.8 \text{ Hz}$, 0.5 H, $\text{CH}_{2b}\text{-S}$), 3.08 – 3.31 (m, 2 H, $4'\text{-CH}_2$), 3.38 – 3.51 (m, 0.5 H, $5'\text{-CH}$), 3.53 – 3.64 (m, 0.5 H, $5'\text{-CH}$), 3.68 (d, $^2J = 17.6 \text{ Hz}$, 0.5 H, $2'\text{-CH}_{2a}$), 3.91 – 4.10 (m, 1.5 H, $2'\text{-CH}_{2a}$, $2'\text{-CH}_{2b}$), 4.15 – 4.25 (m, 1 H, $9''\text{-CH}$), 4.25 – 4.41 (m, 2.5 H, $\text{CH}_{2a}\text{-Thymin}$, $\text{CH}_2\text{-O}$), 4.44 (d, $^2J = 12.9 \text{ Hz}$, 0.5 H, $\text{CH}_{2a}\text{-Thymin}$), 4.51 (d, $^2J = 16.6 \text{ Hz}$, 0.5 H, $\text{CH}_{2b}\text{-Thymin}$), 4.67 (d, $^2J = 16.7 \text{ Hz}$, 0.5 H, $\text{CH}_{2b}\text{-Thymin}$), 7.06 (d, $^4J = 1.0 \text{ Hz}$, 0.5 H, 6-CH), 7.11 (s, 0.5 H, 6-CH), 7.14 – 7.44 (m, 19 H, $3\times \text{Ph-H}_5$, $2''\text{-CH}$, $3''\text{-CH}$, $6''\text{-CH}$, $7''\text{-CH}$), 7.58 – 7.67 (m, 2 H, $1''\text{-CH}$, $8''\text{-CH}$), 7.76 (d, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, 2 H, $4''\text{-CH}$, $5''\text{-CH}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD): δ = [2 Rotamere] 12.28 ($\text{C}_q\text{-CH}_3$), 35.09, 35.59 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 48.39 ($9''\text{-CH}$), 49.14, 49.20 ($\text{CH}_2\text{-Thymin}$), 50.57, 50.61 ($2'\text{-CH}_2$), 50.88, 51.26 ($5'\text{-CH}$), 52.13, 52.20 ($4'\text{-CH}_2$), 67.68, 67.82 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 68.03, 68.41 (S-C_q), 110.85, 110.88 (5-C_q), 120.91 ($4''\text{-CH}$, $5''\text{-CH}$), 126.25, 126.38 ($1''\text{-CH}$, $8''\text{-CH}$), 127.86, 127.99, 128.17, 128.22, 128.77, 128.98, 129.08, 130.1 ($2''\text{-CH}$, $3''\text{-CH}$, $6''\text{-CH}$, $7''\text{-CH}$, $3\times o\text{-CH}$, $3\times m\text{-CH}$), 143.35, 143.43 (6-CH), 145.14, 145.25, 145.40, 145.58 ($4a''\text{-C}_q$, $4b''\text{-C}_q$, $8a''\text{-C}_q$, $9a''\text{-C}_q$), 145.92, 146.03 ($3\times \text{C}_q^{\text{Trt}}$), 152.76 (2-C_q), 158.21 ($\text{NH-C}_q\text{=O-O}$), 166.88, 166.91, 169.68, 170.17, 172.11, 172.17 (4-C_q , $1'\text{-C}_q$, $\text{C}_q\text{-CH}_2\text{-Thymin}$).

m/z (HR-ESI-FT-ICR-MS): 817.2666 (ber. für $\text{C}_{46}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{NaO}_7\text{S}^+$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 817.2666).

6.2.6 PNA-Festphasensynthese

6.2.6.1 Protokoll zur automatisierten Festphasensynthese nach der Fmoc/Bhoc-Strategie

Fmoc-Abspaltung:

Das Harz wird zweimal für 2 Minuten mit je 200 μL *N,N*-Dimethylformamid/Piperidin (4:1, v/v) behandelt. Anschließend wird das Harz elfmal mit je 200 μL *N,N*-Dimethylformamid gewaschen.

Kupplung von PNA-Monomeren:

In einem Voraktivierungsgefäß werden 40 µL (8.0 µmol, 4.0 Äq, 0.2 M in *N*-Methyl-2-pyrrolidon) PNA-Monomer, 4 µL (16.0 µmol, 8.0 Äq, 4.0 M in *N,N*-Dimethylformamid) *N*-Methylmorpholin und 12 µL (7.2 µmol, 3.6 Äq, 0.6 M in *N*-Methyl-2-pyrrolidon) HCTU gemischt. Nach 4 Minuten wird das Harz für 30 Minuten mit 50 µL der Kupplungslösung behandelt. Bei Mehrfachkuppelungen wird die Kupplungslösung abgesaugt und die Prozedur entsprechend oft wiederholt. Anschließend wird das Harz dreimal mit je 200 µL *N,N*-Dimethylformamid gewaschen.

Capping:

Das Harz wird für 2 Minuten mit 200 µL *N,N*-Dimethylformamid/Essigsäureanhydrid/2,6-Lutidin (89:5:6, v/v) behandelt und nachfolgend fünfmal mit je 200 µL *N,N*-Dimethylformamid gewaschen.

Terminale Fmoc-Abspaltung:

Das Harz wird zwölfmal mit je 200 µL *N,N*-Dimethylformamid gewaschen. Danach wird das Harz zweimal für 3 Minuten mit je 200 µL *N,N*-Dimethylformamid/Piperidin (4:1, v/v) behandelt. Anschließend wird das Harz siebenmal mit je 200 µL *N,N*-Dimethylformamid und dreimal mit je 200 µL Ethanol gewaschen.

Freisetzung vom Träger und Bhoc-Abspaltung:

Das Harz wird in einen 2 mL-Spritzenreaktor überführt. Bei Thiol-modifizierten PNA-Oligomeren werden 1 mL TFA/EDT/*i*Pr₃SiH/Wasser (850:25:25:50, v/v), bei unmodifizierten PNA-Oligomeren 1 mL TFA/*m*-Kresol/Triisopropylsilan/Wasser (85:5:5:5, v/v) zugegeben und die erhaltene Suspension 90 Minuten geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und zweimal mit je 200 µL TFA gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden unter vermindertem Druck auf ca. 100 µL eingeeengt. Nach Zugabe von 1 mL kalten Diethylether fällt das Rohprodukt aus. Die erhaltene Suspension wird zentrifugiert und der Niederschlag mit 1 mL kalten Diethylether gewaschen.

Reinigung:

Das Rohprodukt wird in Wasser/Acetonitril (9:1, v/v) gelöst und mittels semi-präparativer HPLC (3→17 % B1 in 30 min, Säule 7) gereinigt. Das Acetonitril der Produktfraktion wird unter vermindertem Druck bei Raumtemperatur entfernt und die verbliebene wässrige Lösung lyophilisiert.

6.2.6.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die automatisierte Synthese von PNA-Oligomeren

In einem Reaktor wurden 2 μmol Fmoc-Lys-beladenes NovaSyn® TGR-Harz (Beladungsgrad: 80 – 180 $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$) durch mehrmaliges Waschen mit *N,N*-Dimethylformamid gequollen. Entsprechend dem Protokoll der automatisierten Festphasensynthese nach der Fmoc/Bhoc-Strategie (Kapitel 6.2.6.1) wurde zunächst die Fmoc-Gruppe abgespalten. Beim anschließenden Aufbau der PNA-Oligomere wurden bis zum zehnten Monomer Einfachkupplungen, danach Doppelkupplungen und für die letzten beiden Monomere in der Sequenz Dreifachkupplungen durchgeführt. Abweichend davon wurden das rückgratmodifizierte PNA-Monomer **19** sowie das darauf folgende Monomer doppelt gekuppelt.

H-actt(CH₂SH)acctcacgc-Lys-NH₂ (73)

Ausbeute: $\text{OD}_{260} = 40.5$ ($\epsilon_{260} = 116400 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), 348.0 nmol, 17.4 %.

m/z (MALDI-TOF-MS): 3615; m/z (ESI-QP-MS): 3613.3 (ber. für $\text{C}_{144}\text{H}_{190}\text{N}_{73}\text{O}_{40}\text{S}^+ [\text{M} + \text{H}]^+$: 3613.4798).

HPLC: $t_R = 11.5 \text{ min}$ (3→30 % B1 in 20 min, Säule 1).

H-cagtcacatagt(CH₂SH)tcc-Lys-NH₂ (74)

Ausbeute: $\text{OD}_{260} = 39.9$ ($\epsilon_{260} = 123600 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), 323.0 nmol, 16.1 %.

m/z (MALDI-TOF-MS): 3673; m/z (ESI-QP-MS): 3668.5 (ber. für $\text{C}_{146}\text{H}_{191}\text{N}_{74}\text{O}_{41}\text{S}^+ [\text{M} + \text{H}]^+$: 3668.4856).

HPLC: $t_R = 12.0 \text{ min}$ (3→30 % B1 in 20 min, Säule 1).

H-aactcctgtt(CH₂SH)gct-Lys-NH₂ (75)

Ausbeute: $\text{OD}_{260} = 34.5$ ($\epsilon_{260} = 114600 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), 301.6 nmol, 15.1 %.

m/z (MALDI-TOF-MS): 3654 (ber. für $\text{C}_{146}\text{H}_{192}\text{N}_{71}\text{O}_{43}\text{S}^+ [\text{M} + \text{H}]^+$: 3659.4735).

HPLC: $t_R = 12.5 \text{ min}$ (3→30 % B1 in 20 min, Säule 1).

H-acttacctcacgc-Lys-NH₂ (76)

Ausbeute: $\text{OD}_{260} = 25.2$ ($\epsilon_{260} = 116400 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), 216.3 nmol, 10.8 %.

m/z (MALDI-TOF-MS): 3571; m/z (ESI-QP-MS): 3567.3 (ber. für $\text{C}_{143}\text{H}_{188}\text{N}_{73}\text{O}_{40}^+ [\text{M} + \text{H}]^+$: 3567.4921).

HPLC: $t_R = 11.2 \text{ min}$ (3→30 % B1 in 20 min, Säule 1).

H-cagtcatagttcc-Lys-NH₂ (77)

Ausbeute: OD₂₆₀ = 22.4 (ϵ_{260} = 123600 L·mol⁻¹·cm⁻¹), 181.6 nmol, 9.1 %.

m/z (MALDI-TOF-MS): 3626; m/z (ESI-QP-MS): 3622.2 (ber. für C₁₄₅H₁₈₉N₇₄O₄₁⁺ [M + H]⁺: 3622.4979).

HPLC: t_R = 11.7 min (3→30 % B1 in 20 min, Säule 1).

H-aactcctgttgct-Lys-NH₂ (78)

Ausbeute: OD₂₆₀ = 29.1 (ϵ_{260} = 114600 L·mol⁻¹·cm⁻¹), 254.3 nmol, 12.7 %.

m/z (MALDI-TOF-MS): 3613 (ber. für C₁₄₅H₁₉₀N₇₁O₄₃⁺ [M + H]⁺: 3613.4858).

HPLC: t_R = 11.6 min (3→30 % B1 in 20 min, Säule 1).

H-caatcgtatccag-Lys-NH₂ (79)

Ausbeute: OD₂₆₀ = 28.1 (ϵ_{260} = 127400 L·mol⁻¹·cm⁻¹), 220.9 nmol, 11.0 %.

m/z (MALDI-TOF-MS): 3630; m/z (ESI-QP-MS): 3632.2 (ber. für C₁₄₅H₁₈₈N₇₇O₃₉⁺ [M + H]⁺: 3631.5095).

HPLC: t_R = 11.3 min (3→30 % B1 in 20 min, Säule 1).

6.2.7 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Ligation von Maleimidoglykosiden an Thiol-modifizierte PNA

1 Äquivalent Thiol-modifizierte PNA **73**, **74** oder **75** (350 – 1000 μ M in Wasser) und 1.8 – 3.0 Äquivalente Maleimidoglykosid **16**, **17** oder **18** (5 – 20 mM in Wasser) wurden mit frisch entgasten Puffer (10 mM NaH₂PO₄, 0.3 mM TCEP, pH 6.5) auf eine Konzentration von 100 μ M Thiol-modifizierte PNA **73**, **74** oder **75** verdünnt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 30 °C geschüttelt und der Reaktionsfortschritt mittels MALDI-Massenspektrometrie verfolgt. Nach vollständiger Umsetzung der Thiol-modifizierten PNA **73**, **74** oder **75** (ca. 6 – 24 Stunden) wurde das Reaktionsgemisch lyophilisiert, der erhaltene Rückstand in Wasser aufgenommen und mittels semi-präparativer HPLC (3→17 % B1 in 30 min, Säule 7) gereinigt. Das Acetonitril der Produktfraktion wurde unter vermindertem Druck entfernt und die verbliebene wässrige Lösung auf eine Sep-Pak® C18-Säule (mit Wasser äquilibriert) gegeben. Die Säule wurde mit 3 mL Wasser gespült und das Produkt mit Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (1:1:4·10⁻⁶, v/v) eluiert. Das Acetonitril der Produktfraktion wurde unter vermindertem Druck entfernt und die verbliebene wässrige Lösung lyophilisiert.

H-actt(CH₂S~βLacNAc)acctcacgc-Lys-NH₂ (82)

Ausbeute: OD₂₆₀ = 22.0 (ϵ_{260} = 116400 L·mol⁻¹·cm⁻¹), 188.6 nmol, 94 %.

m/z (MALDI-TOF-MS): 4196; *m/z* (ESI-QP-MS): 4190.5 (ber. für C₁₆₇H₂₂₅N₇₆O₅₄S⁺ [M + H]⁺: 4190.6917).

HPLC: *t_R* = 11.3 min (3→30 % B1 in 20 min, Säule 1).

H-cagtcacagt(CH₂S~βLacNAc)tcc-Lys-NH₂ (84)

Ausbeute: OD₂₆₀ = 15.6 (ϵ_{260} = 123600 L·mol⁻¹·cm⁻¹), 125.9 nmol, 98 %.

m/z (MALDI-TOF-MS): 4248; *m/z* (ESI-QP-MS): 4245.3 (ber. für C₁₆₉H₂₂₆N₇₇O₅₅S⁺ [M + H]⁺: 4245.6975).

HPLC: *t_R* = 11.8 min (3→30 % B1 in 20 min, Säule 1).

H-actt(CH₂S~αMan)acctcacgc-Lys-NH₂ (83)

Ausbeute: OD₂₆₀ = 12.4 (ϵ_{260} = 116400 L·mol⁻¹·cm⁻¹), 106.6 nmol, 78 %.

m/z (MALDI-TOF-MS): 3990 (ber. für C₁₅₉H₂₁₂N₇₅O₄₉S⁺ [M + H]⁺: 3987.6123).

HPLC: *t_R* = 12.5 min (3→30 % B1 in 20 min, Säule 1).

H-cagtcacagt(CH₂S~αMan)tcc-Lys-NH₂ (85)

Ausbeute: OD₂₆₀ = 11.0 (ϵ_{260} = 123600 L·mol⁻¹·cm⁻¹), 89.1 nmol, 74 %.

m/z (MALDI-TOF-MS): 4045 (ber. für C₁₆₁H₂₁₃N₇₆O₅₀S⁺ [M + H]⁺: 4042.6182).

HPLC: *t_R* = 12.9 min (3→30 % B1 in 20 min, Säule 1).

H-actt(CH₂S~βsLe^x)acctcacgc-Lys-NH₂ (87)

Ausbeute: OD₂₆₀ = 8.2 (ϵ_{260} = 116400 L·mol⁻¹·cm⁻¹), 70.3 nmol, 70 %.

m/z (MALDI-TOF-MS): 4623 (ber. für C₁₈₄H₂₅₃N₇₇O₆₆S⁺: [M + H]⁺: 4628.8523).

HPLC: *t_R* = 11.4 min (3→30 % B1 in 20 min, Säule 1).

H-aactcctgtt(CH₂S~βsLe^x)gct-Lys-NH₂ (88)

Ausbeute: OD₂₆₀ = 10.3 (ϵ_{260} = 116400 L·mol⁻¹·cm⁻¹), 90.2 nmol, 72 %.

m/z (MALDI-TOF-MS): 4669 (ber. für C₁₈₆H₂₅₅N₇₅O₆₉S⁺ [M + H]⁺: 4674.8466).

HPLC: *t_R* = 11.7 min (3→30 % B1 in 20 min, Säule 1).

6.2.8 Aptamer-PNA-Konjugate

6.2.8.1 5'-[N-(3'-Maleimidopropanoyl)-6-aminohexyl]-GCG GTA ACC AGT ACA AGG TGC TAA ACG TAA TGG CGC-3' (22)

Zu einer Lösung von 812 μL (900 nmol, 1 \AA q, 1108 μM in Wasser) 5'-(6-Aminoheptyl)-GCG GTA ACC AGT ACA AGG TGC TAA ACG TAA TGG CGC-3' (**89**) in 5000 μL Puffer (0.1 M NaH_2PO_4 , pH 6.5) wurden 2250 μL (225 μmol , 250 \AA q, 0.1 M in Dioxan) *N*-Succinimidyl-3-maleimidopropionat (**81**)^[164-165] gegeben. Die erhaltene Suspension wurde bei 40 °C geschüttelt, wobei sich der Niederschlag auflöste, und der Reaktionsfortschritt mittels analytischer HPLC (3 % B3 für 4 min, dann 3→15 % B3 in 40 min, Säule 5) verfolgt. Nach vollständiger Umsetzung der Aminoheptyl-modifizierten DNA **93** (ca. 24 Stunden) wurde das Reaktionsgemisch lyophilisiert, der erhaltene Rückstand in 10 mM Natriumdihydrogenphosphat-Puffer (pH 6.5) aufgenommen und auf eine Sep-Pak® C18-Säule (mit 10 mM Natriumdihydrogenphosphat-Puffer (pH 6.5) äquilibriert) gegeben. Nach Elution der Nebenprodukte mit 10 mM Natriumdihydrogenphosphat-Puffer (pH 6.5), wurde das Produkt mit Acetonitril/50 mM Natriumdihydrogenphosphat-Puffer (pH 6.5) (1:1, v/v) eluiert. Das Acetonitril der Produktfraktion wurde unter vermindertem Druck entfernt und die verbliebene wässrige Lösung lyophilisiert.

Ausbeute: $\text{OD}_{260} = 322$ ($\epsilon_{260} = 358000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), 900 nmol, quantitativ.

m/z (MALDI-TOF-MS): 11469 (ber. für $\text{C}_{365}\text{H}_{457}\text{N}_{148}\text{O}_{215}\text{P}_{36}^-$ [M - H] $^-$: 11466.9936).

HPLC: $t_R = 3.31 \text{ min}$ (3→15 % B3 in 4 min, Säule 4).

6.2.8.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Ligation von Maleinimid-funktionalisierter DNA an Thiol-modifizierte PNA

Es wurden 1 Äquivalent 5'-[N-(3'-Maleimidopropanoyl)-6-aminoheptyl]-GCG GTA ACC AGT ACA AGG TGC TAA ACG TAA TGG CGC-3' (**22**) (500 μM in 10 mM Natriumdihydrogenphosphat-Puffer (pH 6.5)) und 1.3 Äquivalente Thiol-modifizierte PNA **73** oder **75** (350 – 1000 μM in Wasser) mit frisch entgastem Puffer (10 mM NaH_2PO_4 , 10 mM NaCl, 0.3 mM TCEP, pH 6.5) auf eine Konzentration von 130 μM Thiol-modifizierte PNA **73** oder **75** verdünnt. Das Reaktionsgemisch wurde 13 Stunden bei 40 °C geschüttelt und anschließend mit 5 Äquivalenten (50 mM in Dioxan) Benzylmercaptan versetzt. Danach wurde 4 Stunden bei 40 °C geschüttelt und das Reaktionsgemisch mittels semi-präparativer HPLC (3 % B3 für 4 min, dann 3→15 % B3 in 60 min, Säule 6) gereinigt. Das Acetonitril der Produktfraktion wurde unter vermindertem Druck entfernt und die verbliebene wässrige Lösung lyophilisiert.

H-actt(CH₂S~Aptamer)acctcacgc-Lys-NH₂ (90)

Ausbeute: OD₂₆₀ = 6.5 (ϵ_{260} = 473500 L·mol⁻¹·cm⁻¹), 13.6 nmol, 27 %.

HPLC: t_R = 3.31 min (3→15 % B3 in 4 min, Säule 4).

H-aactcctgtt(CH₂S~Aptamer)gct-Lys-NH₂ (91)

Ausbeute: OD₂₆₀ = 7.2 (ϵ_{260} = 471400 L·mol⁻¹·cm⁻¹), 15.3 nmol, 30 %.

HPLC: t_R = 3.32 min (3→15 % B3 in 4 min, Säule 4).


























6.3 Zusammensetzung der multivalenten Kohlenhydrat- und Aptamer-PNA•DNA-Komplexe

6.3.1 Verwendete DNA-Template

T01	5' GGA ACT ATG ACT GGG AAC TAT GAC TGG CGT GAG GTA AGT GCG TGA GGT AAG T 3'
T01a	5' CTG GAT ACG ATT GCT GGA TAC GAT TGG CGT GAG GTA AGT GCG TGA GGT AAG T 3'
T02	5' CTG GAT ACG ATT GCT GGA TAC GAT TGG GAA CTA TGA CTG GCG TGA GGT AAG T 3'
T02a	5' CTG GAT ACG ATT GCT GGA TAC GAT TGA GCA ACA GGA GTT GCG TGA GGT AAG T 3'
T03	5' CTG GAT ACG ATT GGC GTG AGG TAA GTG GAA CTA TGA CTG GCG TGA GGT AAG T 3'
T03a	5' CTG GAT ACG ATT GGC GTG AGG TAA GTC TGG ATA CGA TTG GCG TGA GGT AAG T 3'
T04	5' CTG GAT ACG ATT GGG AAC TAT GAC TGC TGG ATA CGA TTG GCG TGA GGT AAG T 3'
T04a	5' CTG GAT ACG ATT GAG CAA CAG GAG TTC TGG ATA CGA TTG GCG TGA GGT AAG T 3'
T05	5' GCG TGA GGT AAG TGG AAC TAT GAC TGG GAA CTA TGA CTG GCG TGA GGT AAG T 3'
T05a	5' GCG TGA GGT AAG TCT GGA TAC GAT TGC TGG ATA CGA TTG GCG TGA GGT AAG T 3'
T06	5' GGA ACT ATG ACT GCT GGA TAC GAT TGC TGG ATA CGA TTG GCG TGA GGT AAG T 3'
T06a	5' AGC AAC AGG AGT TCT GGA TAC GAT TGC TGG ATA CGA TTG GCG TGA GGT AAG T 3'
T07	5' CTG GAT ACG ATT GGC GTG AGG TAA GTA GCA ACA GGA GTT GCG TGA GGT AAG T 3'
T08	5' GCG TGA GGT AAG TAG CAA CAG GAG TTA GCA ACA GGA GTT GCG TGA GGT AAG T 3'
T09	5' GGT AAG TGC GTG A 3'

6.3.2 Zusammensetzung der multivalenten Kohlenhydrat-PNA•DNA-Komplexe

Tabelle 14: Zusammensetzung der multivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplexe.

Komplex		DNA-Templat	82/Äq	84/Äq	76/Äq	77 /Äq	79/Äq
L00		T05	-	-	2	2	-
L00a		T05a	-	-	2	-	2
L00b		T03	-	-	1	1	2
L01		T01	2	-	-	2	-
L01a		T01a	2	-	-	-	2
L02		T02	1	1	-	-	2
L02a		T02	1	1	-	-	-
L03		T03	2	-	-	1	1
L03a		T03a	2	-	-	-	2
L04		T03	2	-	-	-	-
L04a		T03a	2	-	-	-	-
L05		T04	1	1	-	-	2
L06		T04	1	1	-	-	-
L07		T05	2	-	-	2	-
L07a		T05a	2	-	-	-	2
L08		T05	2	-	-	-	-
L08a		T05a	2	-	-	-	-
L09		T06	1	1	-	-	2
L10		T06	1	1	-	-	-
L11		T03	-	1	2	-	1
L11a		T04	-	1	1	-	2
L12		T03	2	1	-	-	1
L13		T05	2	2	-	-	-
L14		T09	1	-	-	-	-
LM1		T04	1	1 ^[a]	-	-	2

[a] Verwendung von Man-PNA-Konjugat 85 statt LacNAc-PNA-Konjugat 84.

Tabelle 15: Zusammensetzung der multivalenten Man-PNA•DNA-Komplexe




































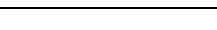








Komplex	DNA-Templat	83/Åq	85/Åq	76/Åq	77/Åq	79/Åq
M00 	T05	-	-	2	2	-
M01 	T01	2	-	-	2	-
M02 	T02	1	1	-	-	2
M03 	T03	2	-	-	1	1
M04 	T03	2	-	-	-	-
M05 	T04	1	1	-	-	2
M06 	T04	1	1	-	-	-
M07 	T05	2	-	-	2	-
M08 	T05	2	-	-	-	-
M09 	T06	1	1	-	-	2
M10 	T06	1	1	-	-	-
M11 	T03	-	1	2	-	1
M12 	T03	2	1	-	-	1
M13 	T05	2	2	-	-	-
M14 	T09	1	-	-	-	-

Tabelle 16: Zusammensetzung der multivalenten sLe^x-PNA•DNA-Komplexe.

Komplex	DNA-Templat	87/Åq	88/Åq	76/Åq	78/Åq	79/Åq
S00 	T01a	-	-	2	-	2
S00a 	T02a	-	-	1	1	2
S00b 	T03a	-	-	2	-	2
S00c 	T04a	-	-	1	1	2
S00d 	T05a	-	-	2	-	2
S00e 	T06a	-	-	1	1	2
S00f 	T07	-	-	2	1	1
S01 	T01a	2	-	-	-	2
S02 	T02a	1	1	-	-	2
S03 	T03a	2	-	-	-	2
S04 	T03a	2	-	-	-	-
S05 	T04a	1	1	-	-	2
S06 	T04a	1	1	-	-	-
S07 	T05a	2	-	-	-	2
S08 	T05a	2	-	-	-	-
S09 	T06a	1	1	-	-	2
S10 	T06a	1	1	-	-	-
S11 	T07	-	1	2	-	1
S12 	T07	2	1	-	-	1
S13 	T08	2	2	-	-	-
S14 	T09	1	-	-	-	-

6.3.3 Zusammensetzung der multivalenten Aptamer-PNA•DNA-Komplexe

Tabelle 17: Zusammensetzung der multivalenten Aptamer-PNA•DNA-Komplexe.

Komplex	DNA-Templat	90/Äq	91/Äq	76/Äq	78/Äq	79/Äq
A00 	T01a	-	-	2	-	2
A00a 	T02a	-	-	1	1	2
A00b 	T03a	-	-	2	-	2
A00c 	T04a	-	-	1	1	2
A00d 	T05a	-	-	2	-	2
A00e 	T06a	-	-	1	1	2
A00f 	T07	-	-	2	1	1
A01 	T01a	2	-	-	-	2
A02 	T02a	1	1	-	-	2
A03 	T03a	2	-	-	-	2
A04 	T03a	2	-	-	-	-
A05 	T04a	1	1	-	-	2
A06 	T04a	1	1	-	-	-
A07 	T05a	2	-	-	-	2
A08 	T05a	2	-	-	-	-
A09 	T06a	1	1	-	-	2
A10 	T06a	1	1	-	-	-
A11 	T07	-	1	2	-	1
A11a 	T02a	-	1	1	-	2
A12 	T07	2	1	-	-	1
A13 	T08	2	2	-	-	-
A14 	T09	1	-	-	-	-

6.4 Assays

6.4.1 SPR-basierter Assay

6.4.1.1 Beladung der Sensor-Chips

Die Beladung der Sensor-Chips (Typ CM5) erfolgte bei einer Flussrate von $5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ unter Verwendung von frisch entgastem HBS-EP-Puffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % Surfactant P20, pH 7.4). Nach Äquilibration mit Puffer wurde die Sensoroberfläche durch einen 7-minütigen Puls einer 1:1-Mischung aus 0.1 M *N*-Hydroxysuccinimid und 0.4 M *N*-Ethyl-*N'*-(dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid aktiviert (ca. 70 RU). Eine Lösung von Lektin (ECL: $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, RCA₁₂₀: $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ConA: $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in 10 mM Natriumacetat (pH 4.5) wurde über die aktivierte Oberfläche des Sensor-Chips geleitet bis der jeweilige Grad an immobilisierten Lektin (hohe Beladung ECL: 2700, niedrige Beladung ECL: 700 RU, RCA₁₂₀: 300 RU, ConA: 1200 RU) erreicht war. Verbliebene *N*-Hydroxysuccinimidester wurden durch einen 7-minütigen Puls einer 1.0 M Ethanolaminhydrochlorid-Lösung (pH 8.5) blockiert. Die Referenzkanäle wurden in analoger Weise behandelt, die Lektine jedoch durch einen 4-minütigen Puls einer 6.0 M Guanidinhydrochlorid-Lösung (pH 1.5) anschließend denaturiert. Mit ECL beladene Sensor-Chips wurden bei 4 °C in Gegenwart von Kieselgel (Chameleon® C 1-3 mm) gelagert, während mit RCA₁₂₀ oder ConA beladene Sensor-Chips bei 4 °C in Laufpuffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, pH 7.4) gelagert wurden.

6.4.1.2 Herstellung der Proben













Gemäß Kapitel 6.3.2 wurden 10 – 30 μM Stammlösungen der entsprechenden LacNAc- bzw. Man-PNA•DNA-Komplexe in Laufpuffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, pH 7.4) hergestellt. Die Lösungen wurden für 3 Minuten bei 50 °C inkubiert und, nach Abkühlen auf Raumtemperatur, in Proben mit Konzentrationen von 0.625 – 30 μM verdünnt.

6.4.1.3 Kinetische Messungen

Die SPR-Experimente wurden bei einer Flussrate von $20 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ unter Verwendung von frisch entgastem Laufpuffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, pH 7.4) durchgeführt. Nach Äquilibration mit Puffer wurden die Proben mit einer Assoziationsphase von 90 Sekunden injiziert, gefolgt von einer Dissoziationsphase von 240 Sekunden. Die Sensoroberfläche wurde bei den LacNAc-PNA•DNA-Komplexen durch einen 30-sekündigen Puls einer 10 mM Natriumacetat-Lösung (pH 4.5), bei Asialofetuin durch einen 30-sekündigen Puls einer 20 mM Salzsäure-Lösung und bei den Man-PNA•DNA-Komplexen durch einen 30-sekündigen Puls einer 100 mM Methyl- α -D-mannosid-Lösung regeneriert. Nach Subtraktion von Referenz-















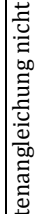
kanal und negativer Blindprobe wurden die Sensorgramme erhalten. Die Güte der Datenanpassung wurde durch den statistischen Wert χ^2 und die Form der berechneten Kurve im Vergleich zu den experimentellen Daten beurteilt. Bis auf wenige Ausnahmen wurden Werte $\chi^2 < 10$ erhalten. Die kinetischen Parameter wurden mit Hilfe der BIAevaluation Software 4.1 durch globale Angleichung der Sensorgrammdaten an das Langmuir-Modell (1:1-Bindung) und das Steady-State-Modell berechnet.

Tabelle 18: Kinetikparameter der Bindung der LacNAc-PNA•DNA-Komplexe an oberflächenimmobilisiertes ECL. Bestimmt mittels SPR.

Substrat	Abstand/Å	Niedrige ECL-Konzentration					Hohe ECL-Konzentration				
		Langmuir-Modell (1:1-Bindung)					Langmuir-Modell (1:1-Bindung)				
		$k_a/M^{-1}\cdot s^{-1}$	k_d/s^{-1}	$K_D/\mu M$	χ^2	$K_D/\mu M$	$k_a/M^{-1}\cdot s^{-1}$	k_d/s^{-1}	$K_D/\mu M$	χ^2	$K_D/\mu M$
Asialofetuin	-	$4.8 \cdot 10^3$	$3.1 \cdot 10^{-3}$	0.6	8.96	[a]	$2.5 \cdot 10^3$	$1.5 \cdot 10^{-3}$	0.6	199	[a]
L00 	-	n. b. [c]	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	[b]	[b]	[b]	[b]	[b]
L01 	42	$2.0 \cdot 10^3$	$8.7 \cdot 10^{-2}$	43	0.92	1290	$4.1 \cdot 10^3$	$4.5 \cdot 10^{-2}$	11	2.70	22
L02 	62	$2.3 \cdot 10^3$	$9.4 \cdot 10^{-2}$	40	0.86	159	$4.9 \cdot 10^3$	$5.6 \cdot 10^{-2}$	12	1.71	20
L05 	104	$3.3 \cdot 10^3$	$6.9 \cdot 10^{-2}$	21	6.33	64	$4.1 \cdot 10^3$	$5.0 \cdot 10^{-2}$	12	2.94	36
L06 	104	$4.7 \cdot 10^3$	$5.6 \cdot 10^{-2}$	12	1.03	28	$4.3 \cdot 10^3$	$5.2 \cdot 10^{-2}$	12	1.87	31
L07 	127	$4.1 \cdot 10^3$	$7.2 \cdot 10^{-2}$	18	1.17	34	$5.6 \cdot 10^3$	$5.2 \cdot 10^{-2}$	9	4.32	31
L08 	127	$7.8 \cdot 10^3$	$9.5 \cdot 10^{-2}$	12	0.43	21	$5.1 \cdot 10^3$	$4.6 \cdot 10^{-2}$	9	4.18	21
L09 	146	$3.7 \cdot 10^3$	$8.4 \cdot 10^{-2}$	23	0.96	53	$4.2 \cdot 10^3$	$4.6 \cdot 10^{-2}$	11	3.98	21
L11 	-	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	$4.0 \cdot 10^2$	$3.2 \cdot 10^{-1}$	800	1.58	407
L12 	62, 23	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	$6.0 \cdot 10^3$	$1.5 \cdot 10^{-2}$	2.6	14.7	[a]
L13 	62, 42, 23	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	$6.8 \cdot 10^3$	$7.7 \cdot 10^{-3}$	1.1	22.5	[a]
L14 	42	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	$9.4 \cdot 10^2$	$2.3 \cdot 10^{-3}$	2.5	6.92	[a]

[a] Datenangleichung nicht durchführbar; [b] keine Bindung; [c] nicht bestimmt.

Tabelle 19: Kinetikparameter der Bindung der LacNAc-PNA•DNA-Komplexe an oberflächenimmobilisiertes RCA₁₂₀. Für die Komplexe **L01**, **L02** und **L03** sind der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten sowie die Standardabweichung angegeben. Bestimmt mittels SPR.

Komplex	Abstand/Å	Langmuir-Modell (1:1-Bindung)				Steady-State-Modell	
		$k_a/M^{-1} \cdot s^{-1}$	k_d/s^{-1}	$K_D/\mu M$	χ^2	$K_D/\mu M$	χ^2
 M05	-	[b]	[b]	[b]	[b]	[b]	[b]
 L01	42	$(1.2 \pm 0.4) \cdot 10^4$	$(3.3 \pm 0.4) \cdot 10^{-1}$	29 ± 5	0.56 ± 0.10	16 ± 2	0.12 ± 0.01
 L02	62	$(3.1 \pm 0.7) \cdot 10^4$	$(1.8 \pm 1.0) \cdot 10^{-1}$	5.5 ± 2	0.54 ± 0.23	7.7 ± 1	0.06 ± 0.07
 L03	85	$(1.2 \pm 0.4) \cdot 10^4$	$(4.2 \pm 0.4) \cdot 10^{-1}$	16 ± 2	0.40 ± 0.02	16 ± 2	0.03 ± 0.02
 L04	85	$2.1 \cdot 10^4$	$2.6 \cdot 10^{-1}$	12	0.77	15	0.18
 L05	104	$1.6 \cdot 10^4$	$2.3 \cdot 10^{-1}$	14	0.71	8.2	0.21
 L06	104	$2.0 \cdot 10^4$	$2.0 \cdot 10^{-1}$	10	0.92	5.4	0.08
 L07	127	$2.7 \cdot 10^4$	$4.2 \cdot 10^{-1}$	15	0.59	14	0.03
 L08	127	$3.2 \cdot 10^4$	$3.5 \cdot 10^{-1}$	11	0.40	16	0.10
 L09	146	$2.6 \cdot 10^4$	$5.2 \cdot 10^{-2}$	2.0	2.68	3.6	0.17
 L10	146	$3.9 \cdot 10^4$	$3.5 \cdot 10^{-2}$	0.9	1.48	4.2	0.08
 LM1	-	[a]	[a]	[a]	[a]	256	0.07
 L12	62, 23	$6.2 \cdot 10^4$	$1.7 \cdot 10^{-1}$	2.7	0.34	5.5	0.14
 L13	62, 42, 23	$8.2 \cdot 10^4$	$6.1 \cdot 10^{-2}$	0.7	0.65	2.7	0.36
 L14	42	$1.8 \cdot 10^4$	$2.7 \cdot 10^{-2}$	1.6	0.40	5.7	0.01

[a] Datenangleichung nicht durchführbar; [b] keine Bindung.

6.4.2 Enzym-gekoppelter Lektin-Assay (ELLA)

6.4.2.1 Verwendete Puffer

PBS-Puffer: 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KHPO₄, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4

PBS-T20-Puffer: PBS-Puffer mit 0.05 % Tween20

PBS-S-Puffer: PBS-Puffer mit 0.1 mM MnCl₂, 0.1 mM CaCl₂

PBS-SB-Puffer: PBS-Puffer mit 0.1 mM MnCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 0.1 % BSA

6.4.2.2 Herstellung der Proben

Gemäß Tabelle 14 (Kapitel 6.3.2) wurde eine Stammlösung (40 µM in PBS-Puffer) des entsprechenden LacNAc-PNA•DNA-Komplexes hergestellt, diese für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert und auf Raumtemperatur abkühlen gelassen.

Die Proben wurden entsprechend Tabelle 20 aus Stammlösungen von biotinylierten ECL (ca. 0.2 µM in PBS-S-Puffer) sowie LacNAc-PNA•DNA-Komplex (40 µM in PBS-Puffer), Lactose (200 mM in PBS-SB-Puffer) oder Asialofetuin (ca. 200 µM in PBS-S-Puffer) in PBS-SB-Puffer hergestellt.

Tabelle 20: Konzentrationen der Probenbestandteile für ELLA.

Probe	LacNAc-PNA•DNA-Komplex		Lactose		Asialofetuin	
	$C_{\text{ECL} \sim \text{Biotin}}/\text{nM}$	$C_{\text{Probe}}/\mu\text{M}$	$C_{\text{ECL} \sim \text{Biotin}}/\text{nM}$	$C_{\text{Probe}}/\mu\text{M}$	$C_{\text{ECL} \sim \text{Biotin}}/\text{nM}$	$C_{\text{Probe}}/\mu\text{M}$
1	5	0	5	0	5	0
2	5	0.01	5	0.1	5	0.001
3	5	0.1	5	1	5	0.01
4	5	1	5	10	5	0.1
5	5	5	5	100	5	1
6	5	10	5	1000	5	10
7	5	20	5	10000	5	50
8	5	30	5	50000	5	100
9	0	0	0	0	0	0

6.4.2.3 Standard-Protokoll für ELLA

Beschichtung der Oberflächen:

50 μL /Näpfchen Asialofetuin:BSA ($5:50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in PBS-Puffer) wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Näpfchen viermal mit je 100 μL /Näpfchen PBS-T20-Puffer gewaschen.

Blockierung freier Oberflächen:

100 μL /Näpfchen BSA (1 % in PBS-Puffer) wurden 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Näpfchen viermal mit je 100 μL /Näpfchen PBS-T20-Puffer gewaschen.

Auftragen der Proben:

40 μL /Näpfchen Probe wurde in zweifacher bzw. dreifacher Ausführung 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Näpfchen viermal mit je 100 μL /Näpfchen PBS-T20-Puffer gewaschen.

Auftragen der Streptavidin-markierten Meerrettichperoxidase:

50 μL /Näpfchen Streptavidin-markierte Meerrettichperoxidase ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in PBS-SB-Puffer) wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Näpfchen dreimal mit je 100 μL /Näpfchen PBS-T20-Puffer und zweimal mit je 100 μL /Näpfchen PBS-Puffer gewaschen.













Enzymatische Farbreaktion:

40 μL /Näpfchen 1-Step Turbo TMB Lösung wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μL 1 M Schwefelsäure gestoppt, die Mikrotiterplatten 2 Sekunden lang geschüttelt und die Absorption bei Raumtemperatur und einer Wellenlänge von 450 nm sofort im Anschluss daran bestimmt.

6.4.2.4 Berechnung der IC_{50} -Werte

Für jeden bivalenten LacNAc-PNA•DNA-Komplex wurde der ELLA zwei- oder dreimal durchgeführt und die Standardabweichung bestimmt. Die gemessenen Absorptionen wurden als Funktion vom dekadischen Logarithmus der Probenkonzentration in $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ aufgetragen. Für Probe 1 (siehe Tabelle 20) wurde dieser als -10, für Probe 9 als -1 gesetzt. Die Konzentrationen, bei der 50 % Inhibierung auftraten (IC_{50}), wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism 4.03 durch Angleichung der Daten an eine sigmoidale Dosis-Wirkungs-Kurve mit variablen Anstiegen^[172] berechnet.

Tabelle 21: Konzentrationen für die 50 %ige Inhibierung der Bindung von biotinylierten ECL an oberflächenimmobilisiertes Asialofetuin. Bestimmt mittels ELLA.

	Substrat	Abstand/Å	IC ₅₀ /μM		Substrat	Abstand/Å	IC ₅₀ /μM
	Lactose	-	483.3				
	Asialofetuin	-	0.60				
L00b		-	[a]				
L11a		-	30.4				
L01a		42	11.1 ± 0.8				
L02		62	16.2 ± 2.9				
L03a		85	18.4 ± 1.0	L04a		85	18.8 ± 3.0
L05		104	22.5 ± 0.4	L06		104	15.3 ± 1.5
L07a		127	24.6 ± 0.7	L08a		127	16.1 ± 1.3
L09		146	17.4 ± 2.9	L10		146	15.3 ± 1.9

[a] keine Inhibierung.

6.4.3 Fluoreszenzanisotropie-Assay

6.4.3.1 Verwendete Puffer

FP-Puffer: 0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, pH 7.2

FP-T20-Puffer: FP-Puffer mit 0.05 % Tween20

6.4.3.2 Bestimmung der Dissoziationskonstante

Proben mit 50 nM Lac~FAM **67** und unterschiedlichen Konzentrationen an ECL (0 – 100 μM) wurden aus Stammlösungen von Lac~FAM **67** (ca. 2 μM in FP-Puffer) und ECL (ca. 200 μM in FP-Puffer) in FP-Puffer hergestellt. Von den erhaltenen Proben wurden je 70 μL in die Näpfchen der Mikrotiterplatten pipettiert. Die Fluoreszenzpolarisation ($\lambda_{\text{Ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 520 \text{ nm}$) der Probe ohne ECL wurde gemessen und die Signalstärke für den vertikalen und senkrechten Detektor jeweils auf 35 mP eingestellt. Anschließend wurde die Fluoreszenzanisotropie bei 30 °C über einen Zeitraum von 10 Minuten gemessen. Vor jedem Messpunkt wurden die Mikrotiterplatten 2 Sekunden lang geschüttelt. Nach einer Äquilibration von 5 Minuten wurden die Messpunkte über einen Zeitraum von 5 Minuten aufgenommen und der Mittelwert davon bestimmt. Der Wert für die Probe ohne ECL wurde von allen Werten subtrahiert. Die erhaltenen Anisotropien wurden als Funktion der ECL-Konzentration aufgetragen und die Dissoziationskonstante mit Hilfe der Software GraphPad Prism 4.03 durch Angleichung der Daten an eine Bindungsisotherme ohne Erschöpfung des Rezeptors^[122] berechnet.

6.4.3.3 Bestimmung der IC₅₀-Werte

Gemäß Tabelle 14 (Kapitel 6.3.2) wurde eine Stammlösung (40 µM in FP-Puffer) des entsprechenden LacNAc-PNA•DNA-Komplexes hergestellt, diese für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert und auf Raumtemperatur abkühlen gelassen.

Die Proben wurden entsprechend Tabelle 22 aus Stammlösungen von Lac~FAM **67** (ca. 2 µM in FP-Puffer), ECL (ca. 200 µM in FP-Puffer) sowie LacNAc-PNA•DNA-Komplex (40 µM in FP-Puffer), Lactose (500 µM in FP-Puffer) oder Asialofetuin (ca. 200 µM in FP-Puffer) in FP-T20-Puffer hergestellt.



Tabelle 22: Konzentrationen der Probenbestandteile für die Bestimmung der IC₅₀-Werte mittels Fluoreszenzanisotropie-Assay.

Probe	LacNAc-PNA•DNA-Komplex			Lactose			Asialofetuin		
	<i>C</i> _{Lac~FAM/} nM	<i>C</i> _{ECL/} µM	<i>C</i> _{Inhibitor/} µM	<i>C</i> _{Lac~FAM/} nM	<i>C</i> _{ECL/} µM	<i>C</i> _{Inhibitor/} µM	<i>C</i> _{Lac~FAM/} nM	<i>C</i> _{ECL/} µM	<i>C</i> _{Inhibitor/} µM
1	50	20	0	50	20	0	50	20	0
2	50	20	0.05	50	20	0.5	50	20	0.1
3	50	20	0.5	50	20	1	50	20	0.5
4	50	20	1	50	20	5	50	20	1
5	50	20	5	50	20	25	50	20	5
6	50	20	10	50	20	50	50	20	10
7	50	20	15	50	20	75	50	20	25
8	50	20	20	50	20	100	50	20	50
9	50	20	25	50	20	125	50	20	75
10	50	20	30	50	20	150	50	20	100
11	-	-	-	50	20	175	-	-	-
12	-	-	-	50	20	200	-	-	-
13	-	-	-	50	20	250	-	-	-
14	-	-	-	50	20	300	-	-	-
15	-	-	-	50	20	400	-	-	-
16	50	0	0	50	0	0	50	0	0

Von den erhaltenen Proben wurden je 70 µL in die Näpfchen der Mikrotiterplatten pipettiert. Die Fluoreszenzpolarisation ($\lambda_{\text{Ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 520 \text{ nm}$) der Probe ohne ECL und ohne Inhibitor wurde gemessen und die Signalstärke für den vertikalen und senkrechten Detektor jeweils auf 35 mP eingestellt. Anschließend wurde die Fluoreszenzanisotropie bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 10 Minuten gemessen. Vor jedem Messpunkt wurden die Mikrotiterplatten 2 Sekunden lang geschüttelt. Nach einer Äquilibration von 5 Minuten wurden die Messpunkte

über einen Zeitraum von 5 Minuten aufgenommen und der Mittelwert davon bestimmt. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 23 aufgelistet.

Tabelle 23: Gemessene Fluoreszenzanisotropie r in mAU für die Bestimmung der IC_{50} -Werte.

Probe	L02 	L02a 	Lactose	Asialofetuin
1	26.2	23.4	26.4	43.9
2	26.3	24.7	27.4	44.8
3	26.8	23.8	15.0	43.3
4	27.3	26.4	15.3	42.1
5	30.7	26.4	17.4	44.7 ^[a]
6	29.9	31.3	17.2	39.9 ^[a]
7	31.0	33.9	15.9	38.8 ^[a]
8	32.5	37.3	18.2	41.6 ^[a]
9	37.2	42.5	16.9	45.7 ^[a]
10	39.5	46.5	18.3	48.4 ^[a]
11	-	-	20.2	-
12	-	-	16.6	-
13	-	-	18.0	-
14	-	-	18.4	-
15	-	-	18.6	-
16	18.7	21.0	13.5	21.0

[a] Niederschlagbildung in der Probe.

6.4.4 Kompetitiver SPR-Assay

6.4.4.1 Verwendete Puffer

HBS-EP-Puffer: 10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % Surfactant P20

Laufpuffer: 20 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$

6.4.4.2 Beladung des Sensor-Chips

Die Beladung des Sensor-Chips (Typ SA) erfolgte bei einer Flussrate von $5 \mu L \cdot min^{-1}$ unter Verwendung von frisch entgastem HBS-EP-Puffer. Zu Beginn wurden die Sensoroberflächen des Mess- und Referenzkanals durch drei einminütige Pulse einer 50 mM Natriumhydroxid-Lösung in 1 M Natriumchlorid aktiviert. Anschließend wurde über die aktivierte Oberfläche des Messkanals eine Lösung von biotinylierten sLe^x/sTyr-PAA ($4.2 \mu g \cdot mL^{-1}$) in HBS-EP-Puffer und über die aktivierte Oberfläche des Referenzkanals eine Lösung von biotinylierten LacNAc-PAA ($4.2 \mu g \cdot mL^{-1}$) in HBS-EP-Puffer geleitet bis jeweils ca. 900 RU immobilisiert waren. Der beladene Sensor-Chip wurde bei 4 °C in Laufpuffer gelagert.

6.4.4.3 Herstellung der Proben mit sLe^x-PNA•DNA-Komplex

15.0 μL einer Stammlösung ($\text{OD}_{520} = 1.0$) von Protein A-beschichteten Gold-Nanopartikeln (Durchmesser 15 nm) wurden für 10 min bei 15800 g zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde vorsichtig mit einer Pipette entfernt und das Pellet in 6.0 μL Laufpuffer gelöst. Anschließend wurden 3.0 μL einer 20 nM L-Selektin-IgG-Lösung und 6.0 μL Laufpuffer zugegeben und die Lösung 30 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 15.0 μL Laufpuffer zugegeben. Die erhaltene Stammlösung der mit L-Selektin-beschichteten Gold-Nanopartikel wurde bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

Gemäß Tabelle 16 (Kapitel 6.3.2) wurde eine Stammlösung (20 – 35 μM in Laufpuffer) des entsprechenden sLe^x-PNA•DNA-Komplexes hergestellt, diese für 3 Minuten bei 75 °C inkubiert und auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Die Proben wurden entsprechend Tabelle 24 aus Stammlösungen von L-Selektin-beschichteten Gold-Nanopartikel (ca. 1 nM in Laufpuffer) und sLe^x-PNA•DNA-Komplex (20 – 35 μM in Laufpuffer) hergestellt, 18 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und sofort im Anschluss daran in die Flusszellen injiziert.

Tabelle 24: Konzentrationen der Probenbestandteile für den kompetitiven SPR-Assay mit sLe^x-PNA•DNA-Komplex.

Probe	$C_{\text{Gold-Nanopartikel}}/\text{nM}$	$C_{\text{Komplex}}/\mu\text{M}$
1	0.429	0
2	0.429	1.25
3	0.429	5
4	0.429	10
5	0.429	20

6.4.4.4 Herstellung der Proben mit Aptamer-PNA•DNA-Komplex

30.0 μL einer Stammlösung ($\text{OD}_{520} = 1.0$) von Protein A-beschichteten Gold-Nanopartikeln (Durchmesser 15 nm) wurden für 10 min bei 15800 g zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde vorsichtig mit einer Pipette entfernt und das Pellet in 12.0 μL Laufpuffer gelöst. Anschließend wurden 6.00 μL einer 20 nM L-Selektin-IgG-Lösung und 12.0 μL Laufpuffer zugegeben und die Lösung 30 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die erhaltene Stammlösung der mit L-Selektin-beschichteten Gold-Nanopartikel wurde bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Gemäß Tabelle 16 (Kapitel 6.3.3) wurde eine Stammlösung (3.5 μM in Laufpuffer) des entsprechenden Aptamer-PNA•DNA-Komplexes hergestellt, diese für 3 Minuten bei 75 °C inkubiert und auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Die Proben wurden entsprechend Tabelle 25 aus

Stammlösungen von L-Selektin-beschichteten Gold-Nanopartikel (ca. 2 nM in Laufpuffer) und Aptamer-PNA•DNA-Komplex (3.5 μM in Laufpuffer) hergestellt, 18 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und sofort im Anschluss daran in die Flusskammer injiziert.

Tabelle 25: Konzentrationen der Probenbestandteile für den kompetitiven SPR-Assay mit Aptamer-PNA•DNA-Komplex.

Probe	$c_{\text{Gold-Nanopartikel}}/\text{nM}$	$c_{\text{Komplex}}/\mu\text{M}$
1	0.857	0
2	0.857	1
3	0.857	5
4	0.857	8
5	0.857	10
6	0.857	50

6.4.4.5 SPR-Messungen

































Die SPR-Experimente wurden unter Verwendung von frisch entgastem Laufpuffer durchgeführt. Bei einer Flussrate von $20 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ wurden, nach Äquilibration der Sensoroberfläche mit Laufpuffer, die Proben mit einer Assoziationsphase von 105 Sekunden injiziert, gefolgt von einer Dissoziationsphase von 180 Sekunden. Anschließend wurde die Flussrate auf $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ erhöht und die Sensoroberfläche durch einen 60-sekündigen Puls einer 4 M Magnesiumchlorid-Lösung regeneriert. Nach Subtraktion von Referenzkanal wurden die Sensorgramme erhalten. Das Resonanzsignal zu Beginn der Assoziationsphase ($t = 0 \text{ s}$) wurde von dem Signal am Ende der Dissoziationsphase ($t = 285 \text{ s}$) subtrahiert. Da das Resonanzsignal von Probe 1, d. h. der Wert für 100 % Bindung, linear mit der Zeit abnahm, wurde Probe 1 jeweils am Anfang und am Ende der Messungen gemessen. Die gemessenen Resonanzsignale von Probe 1 wurden als Funktion der Zeit aufgetragen und die Geschwindigkeit der Signalabnahme mittels linearer Regression berechnet. Mit Hilfe dieser Geschwindigkeit konnte das Resonanzsignal von Probe 1 für jeden beliebigen Messzeitpunkt berechnet werden. Am Ende der Messungen wurden die gemessenen Resonanzsignale in relative Bindungssignale umgerechnet, indem diese durch das Resonanzsignal von Probe 1 (abhängig vom Messzeitpunkt) dividiert wurden.

6.4.4.6 Berechnung der IC_{50} -Werte der sLe^x - und Aptamer-PNA•DNA-Komplexe

Für jede Probe wurde die SPR-Messung zwei- oder dreimal durchgeführt. Die relativen Bindungssignale wurden als Funktion vom dekadischen Logarithmus der Probenkonzentration in $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ aufgetragen. Für Probe 1 (siehe Tabelle 24 und Tabelle 25) wurde dieser als -12 gesetzt. Für die Aptamer-PNA•DNA-Komplexe **A00** – **A14** wurden die Konzentrationen, bei der 50 % Inhibierung auftraten (IC_{50}), mit Hilfe der Software GraphPad Prism 4.03 durch Angleichung der Daten an eine sigmoidale Dosis-Wirkungs-Kurve mit variablen Anstiegen^[172] berechnet.

Da für die sLe^x-PNA•DNA-Komplexe **S00** – **S13** keine IC₅₀-Werte bestimmt werden konnten, ist das relative Bindungssignal, dass bei einer Konzentration von 20 µM gemessen wurde, angegeben.

Tabelle 26: Affinitäten der sLe^x- und Aptamer-PNA•DNA-Komplexe für die Inhibierung der Bindung von L-Selektin-beschichteten Gold-Nanopartikeln an oberflächenimmobilisiertes sLe^x/sTyr. Bestimmt mittels kompetitiven SPR-Assay.

		Rel. Bindung				IC ₅₀ /nM
Substrat	Abstand/Å (bei 20 µM)/%	Substrat	Abstand/Å			
S00d 	- [a]	Aptamer 93 	- [a]			21.1 ± 12.0
S00f 	- 29.8 ± 2.9	A00d 	- [a]			
S01 	42 84.7 ± 4.9	A01 	42 6.3 ± 0.6			
S02 	62 72.4 ± 4.9	A02 	62 5.2 ± 0.3			
S03 	85 72.5 ± 2.8	A03 	85 5.2 ± 0.1			
S04 	85 58.0 ^[b]	A04 	85 8.4 ± 0.5			
S05 	104 79.3 ± 1.8	A05 	104 2.0 ± 0.2			
S06 	104 107.5 ± 2.2	A06 	104 7.0 ± 0.6			
S07 	127 45.9 ± 4.5	A07 	127 12.2 ± 5.0			
S08 	127 55.4 ± 8.5	A08 	127 10.2 ± 1.1			
S09 	146 101.8 ± 6.0	A09 	146 2.2 ± 0.1			
S10 	146 88.4 ± 3.0	A10 	146 5.9 ± 0.4			
S11 	- 98.7 ± 1.6	A11 	- 12.9 ± 1.3			
S12 	62, 23 92.6 ± 7.6 ^[c]	A12 	62, 23 1.4 ± 0.4			
S13 	62, 42, 23 91.5 ± 3.2	A13 	62, 42, 23 1.8 ± 0.6			
S14 	42 [d]	A14 	42 [e]			

[a] keine Inhibierung; [b] keine Standardabweichung bestimmt; [c] Für die Bestimmung der relativen Bindung wurde das Signal des unmodifizierten PNA•DNA-Duplexes **S00f** von dem Signal des trivalenten PNA•DNA-Komplexes **S12** abgezogen; [d] nicht bestimmt; [e] Berechnung des IC₅₀ nicht möglich.







6.4.5 Zellbasierter Flusskammer-Assay

Mit L-Selektin transfizierte K562-Zellen^[173] wurden in Hanks' BSS-Puffer suspendiert (Endkonzentration: 1·10⁶ Zellen·mL⁻¹). Zur Beschichtung der Oberfläche wurden 30 µL einer PSGL-1-IgG-Lösung (30 µg·mL⁻¹) in die Flusskammer injiziert und diese 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Flusskammer mit einer BSA-Lösung (2 mg·mL⁻¹ in PBS-Puffer) gespült und zur Blockierung freier Oberflächen 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Gemäß Tabelle 16 (Kapitel 6.3.3) wurde eine Stammlösung (ca. 5 µM in Hanks' BSS-Puffer) des entsprechenden Aptamer-PNA•DNA-Komplexes hergestellt, diese für 3 Minuten bei 75 °C inkubiert und auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Die Aptamer-PNA•DNA-Komplexe wurden in

den entsprechenden Konzentrationen zu den K562-Zellen gegeben und die erhaltenen Proben anschließend 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in eine Spritze überführt und bei einer konstanten Scherspannung von 1 dyn·cm⁻² (0.57 mL·min⁻¹) in die Flusskammer injiziert. Nach 2 Minuten zur Gleichgewichtseinstellung wurde ein einminütiges Video der Flusskammer aufgenommen und die Anzahl der Zellen, die während des Videos rollten, bestimmt.

Für jede Probe wurde die Messung dreimal durchgeführt. Zur Bestimmung der relativen Bindungssignale wurde die Anzahl der rollenden Zellen der Probe ohne Inhibitor als 100 % gesetzt und alle weiteren Signale in Relation dazu gesetzt. Die relativen Bindungssignale wurden als Funktion der Probenkonzentration aufgetragen und die Konzentration, bei der 50 % Inhibierung auftrat (IC₅₀), aus der erhaltenen Kurve ermittelt.

Tabelle 27: Konzentrationen für die 50 %ige Inhibierung (IC₅₀) der Wechselwirkung zwischen L-Selektin-präsentierenden K562-Zellen und oberflächenimmobilisiertem PSGL-1. Bestimmt mittels zellbasierten Flusskammer-Assay.

	Substrat	Abstand/Å	IC ₅₀ /nM
A00d		-	[a]
A11a		-	345
A02		62	14
A05		104	14
A09		146	48
A10		146	72

[a] keine Inhibierung.

6.5 MD-Simulationen

Die Strukturen der Komplexe wurden mit der Software Amira^[140] auf Basis der NMR-Struktur des PNA•PNA-Duplex in Lösung^[69] und einer generischen DNA-Doppelhelix, die mit AmberTools 1.2^[174] generiert wurde, modelliert. Das Rückgrat-modifizierte PNA-Monomer wurde inklusive des kompletten Linkers aber ohne LacNAc-Ligand modelliert. Die PNA-Reste wurden mit der Software Antechamber^[175-176] für das Kraftfeld AMBER 99 SB^[177] parameterisiert, wobei die Ladungen nach der AM1-BCC-Methode^[178-179] berechnet wurden. Der Protonierungsgrad der PNA•DNA-Komplexe in Lösung entsprach dem bei pH 7. Sämtliche Simulationen wurden mit der Software GROMACS 4^[180] und dem entsprechenden Port des AMBER-Kraftfelds ffAMBER^[181] durchgeführt.

Startkonfiguration für die Simulation war eine lineare Konformation des Komplexes. Der Komplex wurde in ungefähr 176000 Molekülen Wasser (TIP3P-Wassermode^[182]) in gleichgroßen

Rhombendodekaedern mit 19.6 nm Kantenlänge gelöst. Zur Neutralisation der Gesamtladung wurde eine adäquate Menge an Kalium-Ionen zu den Simulationskisten gegeben. Danach wurde die Energie des Systems mit dem Algorithmus des steilsten Abfalls minimiert und, zur Beruhigung der Wassermoleküle, 200 ps MD-Simulation mit Einschränkung der Position durchgeführt. Die anschließenden 30 ns MD-Simulation wurden ohne Einschränkung der Position durchgeführt.

Nach Überführung des erhaltenen Komplexes in implizites Wasser, wurde an den Komplex ein konstantes Potential, das den Abstand einschränkte, angelegt, um diesen in eine Konformation zu biegen, in welcher der Abstand zwischen den Linkern dem der Bindungstaschen in der Kristallstruktur von ECL^[111] entsprach. Entsprechend dem oben beschriebenen Protokoll, d. h. inklusive Energieminimierung und MD-Simulation mit Einschränkung der Position zur Beruhigung der Wassermoleküle, wurde der gebogene Komplex wieder in explizites TIP3P-Wasser überführt. Der erhaltene Komplex diente als Startkonfiguration für die Kraftmessungen. Zur Messung der Kraft wurde ein harmonisches Potential, das den Abstand zwischen den Atomen der beiden Linker einschränkte, angelegt und eine 400 ps MD-Trajektorie berechnet, um die durchschnittliche Kraft zu erhalten, die auf den Strang wirkte, um diesen in einer gebogenen Konformation mit korrektem Abstand zwischen den Linkern zu halten.

Um die Temperatur konstant bei 300 K zu halten, wurde ein Druck von 1 bar angelegt, die Geschwindigkeit der Teilchen periodisch neu skaliert^[183] und schwache Kopplungen nach der Methode von Berendsen^[184] angewendet. Eine „twin-range cut-off“ von 1.0/1.4 nm kam für van-der-Waals-Wechselwirkungen zum Einsatz. Für Coulomb-Wechselwirkungen wurde der „smooth particle mesh Ewald“-Algorithmus^[185] mit einer Umschaltenfernung von 1.0 nm angewendet. Während der 30 ns Simulation wurden die Bindungslängen nach dem LINCS-Algorithmus^[186] mit Integrationsschritten von 2 fs eingeschränkt. Bei den Simulationen zur Kraftmessung wurden die Bindungslängen nicht eingeschränkt und die Integrationsschritte betrugen 1 fs.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 637-674.
- [2] H.-J. Gabius, H.-C. Siebert, S. André, J. Jiménez-Barbero, H. Rüdiger, *ChemBioChem* **2004**, 5, 740-764.
- [3] K. Ley, C. Laudanna, M. I. Cybulsky, S. Nourshargh, *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, 7, 678-689.
- [4] J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 531-569.
- [5] M. A. Mulvey, *Cell. Microbiol.* **2002**, 4, 257-271.
- [6] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2754-2794.
- [7] R. J. Pieters, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 2013-2025.
- [8] N. Jayaraman, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 3463-3483.
- [9] F. Diezmann, O. Seitz, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 5789-5801.
- [10] C. F. Brewer, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2002**, 1572, 255-262.
- [11] P. H. von Hippel, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2007**, 36, 79-105.
- [12] P. C. Blainey, A. M. van Oijen, A. Banerjee, G. L. Verdine, X. S. Xie, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103, 5752-5757.
- [13] T. K. Dam, C. F. Brewer, *Biochemistry* **2008**, 47, 8470-8476.
- [14] S.-K. Choi, M. Mammen, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 4103-4111.
- [15] R. P. McEver, C. Zhu, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2010**, 26, 363-396.
- [16] M. A. M. Gakidis, X. Cullere, T. Olson, J. L. Wilsbacher, B. Zhang, S. L. Moores, K. Ley, W. Swat, T. Mayadas, J. S. Brugge, *J. Cell Biol.* **2004**, 166, 273-282.
- [17] D. F. Smith, T. L. Deem, A. C. Bruce, J. Reutershan, D. Wu, K. Ley, *J. Leukocyte Biol.* **2006**, 80, 1491-1499.
- [18] C. Giagulli, L. Ottoboni, E. Caveggion, B. Rossi, C. Lowell, G. Constantin, C. Laudanna, G. Berton, *J. Immunol.* **2006**, 177, 604-611.
- [19] N. C. Kaneider, A. J. Leger, A. Kuliopulos, *FEBS J.* **2006**, 273, 4416-4424.
- [20] D. Vestweber, J. E. Blanks, *Physiol. Rev.* **1999**, 79, 181-213.
- [21] J. Rivera-Nieves, T. L. Burcin, T. S. Olson, M. A. Morris, M. McDuffie, F. Cominelli, K. Ley, *J. Exp. Med.* **2006**, 203, 907-917.
- [22] A. Leppänen, S. P. White, J. Helin, R. P. McEver, R. D. Cummings, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 39569-39578.
- [23] W. S. Somers, J. Tang, G. D. Shaw, R. T. Camphausen, *Cell* **2000**, 103, 467-479.
- [24] A. Leppänen, T. Yago, V. I. Otto, R. P. McEver, R. D. Cummings, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 26391-26400.
- [25] J.-C. Yeh, N. Hiraoka, B. Petryniak, J. Nakayama, L. G. Ellies, D. Rabuka, O. Hindsgaul, J. D. Marth, J. B. Lowe, M. Fukuda, *Cell* **2001**, 105, 957-969.

- [26] H. Kawashima, B. Petryniak, N. Hiraoka, J. Mitoma, V. Huckaby, J. Nakayama, K. Uchimura, K. Kadomatsu, T. Muramatsu, J. B. Lowe, M. Fukuda, *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 1096-1104.
- [27] K. Uchimura, J.-M. Gauguier, M. S. Singer, D. Tsay, R. Kannagi, T. Muramatsu, U. H. von Andrian, S. D. Rosen, *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 1105-1113.
- [28] J. Mitoma, X. Bao, B. Petryanik, P. Schaerli, J.-M. Gauguier, S.-Y. Yu, H. Kawashima, H. Saito, K. Ohtsubo, J. D. Marth, K.-H. Khoo, U. H. von Andrian, J. B. Lowe, M. Fukuda, *Nat. Immunol.* **2007**, *8*, 409-418.
- [29] A. Hidalgo, A. J. Peired, M. K. Wild, D. Vestweber, P. S. Frenette, *Immunity* **2007**, *26*, 477-489.
- [30] M. Dembo, D. C. Torney, K. Saxman, D. Hammer, *Proc. R. Soc. London, B* **1988**, *234*, 55-83.
- [31] B. T. Marshall, M. Long, J. W. Piper, T. Yago, R. P. McEver, C. Zhu, *Nature* **2003**, *423*, 190-193.
- [32] K. K. Sarangapani, T. Yago, A. G. Klopocki, M. B. Lawrence, C. B. Fieger, S. D. Rosen, R. P. McEver, C. Zhu, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 2291-2298.
- [33] T. T. Waldron, T. A. Springer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 85-90.
- [34] T. A. Springer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 91-96.
- [35] J. Lou, T. Yago, A. G. Klopocki, P. Mehta, W. Chen, V. I. Zarnitsyna, N. V. Bovin, C. Zhu, R. P. McEver, *J. Cell Biol.* **2006**, *174*, 1107-1117.
- [36] J. Lou, C. Zhu, *Biophys. J.* **2007**, *92*, 1471-1485.
- [37] T. Yago, J. Wu, C. D. Wey, A. G. Klopocki, C. Zhu, R. P. McEver, *J. Cell Biol.* **2004**, *166*, 913-923.
- [38] H. Setiadi, G. Sedgewick, S. L. Erlandsen, R. P. McEver, *J. Cell Biol.* **1998**, *142*, 859-871.
- [39] H. Setiadi, R. P. McEver, *J. Cell Biol.* **2003**, *163*, 1385-1395.
- [40] H. Setiadi, R. P. McEver, *Blood* **2008**, *111*, 1989-1998.
- [41] J. Rossy, D. Schlicht, B. Engelhardt, V. Niggli, *PLoS One* **2009**, *4*, e5403.
- [42] O. Dwir, G. S. Kansas, R. Alon, *J. Cell Biol.* **2001**, *155*, 145-156.
- [43] A. Ivetič, O. Florey, J. Deka, D. O. Haskard, A. Ager, A. J. Ridley, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 33263-33272.
- [44] G. S. Jacob, C. Kirmaier, S. Z. Abbas, S. C. Howard, C. N. Steininger, J. K. Welply, P. Scudder, *Biochemistry* **1995**, *34*, 1210-1217.
- [45] M. E. Beauharnois, K. C. Lindquist, D. Marathe, P. Vanderslice, J. Xia, K. L. Matta, S. Neelamegham, *Biochemistry* **2005**, *44*, 9507-9519.
- [46] E. E. Simanek, G. J. McGarvey, J. A. Jablonowski, C.-H. Wong, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 833-862.
- [47] N. Kaila, B. E. Thomas IV, *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 566-601.
- [48] A. Seppo, J. P. Turunen, L. Penttilä, A. Keane, O. Renkonen, R. Renkonen, *Glycobiology* **1996**, *6*, 65-71.

- [49] G. B. Sigal, M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3789-3800.
- [50] D. D. Manning, X. Hu, P. Beck, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3161-3162.
- [51] K. Aoi, K. Itoh, M. Okada, *Macromolecules* **1995**, *28*, 5391-5393.
- [52] D. Zanini, R. Roy, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2088-2095.
- [53] P. R. Ashton, E. F. Hounsell, N. Jayaraman, T. M. Nilsen, N. Spencer, J. F. Stoddart, M. Young, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3429-3437.
- [54] J. M. de la Fuente, A. G. Barrientos, T. C. Rojas, J. Rojo, J. Cañada, A. Fernández, S. Penadés, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2257-2261.
- [55] Y. Chen, T. Ji, Z. Rosenzweig, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 581-584.
- [56] J. Zhang, C. D. Geddes, J. R. Lakowicz, *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 253-260.
- [57] P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle, *Nature* **2000**, *403*, 669-672.
- [58] P. I. Kitov, H. Shimizu, S. W. Homans, D. R. Bundle, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3284-3294.
- [59] E. Fan, Z. Zhang, W. E. Minke, Z. Hou, C. L. M. J. Verlinde, W. G. J. Hol, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2663-2664.
- [60] E. A. Merritt, Z. Zhang, J. C. Pickens, M. Ahn, W. G. J. Hol, E. Fan, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8818-8824.
- [61] Z. Zhang, E. A. Merritt, M. Ahn, C. Roach, Z. Hou, C. L. M. J. Verlinde, W. G. J. Hol, E. Fan, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12991-12998.
- [62] Z. Zhang, J. Liu, C. L. Verlinde, W. G. Hol, E. Fan, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7737-7740.
- [63] V. Wittmann, S. Seeberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4348-4352.
- [64] V. Wittmann, S. Seeberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 900-903.
- [65] D. Schwefel, C. Maierhofer, J. G. Beck, S. Seeberger, K. Diederichs, H. M. Moller, W. Welte, V. Wittmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8704-8719.
- [66] P. Braun, B. Nagele, V. Wittmann, M. Drescher, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8428-8431.
- [67] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497-1500.
- [68] E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2796-2823.
- [69] M. Eriksson, P. E. Nielsen, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1996**, *3*, 410-413.
- [70] E. Protozanova, P. Yakovchuk, M. D. Frank-Kamenetskii, *J. Mol. Biol.* **2004**, *342*, 775-785.
- [71] H. Eberhard, F. Diezmann, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4146-4150.
- [72] K. Matsuura, M. Hibino, Y. Yamada, K. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 357-358.
- [73] K. Matsuura, M. Hibino, T. Ikeda, Y. Yamada, K. Kobayashi, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 352-359.
- [74] E. C. Sweeney, A. G. Tonevitsky, D. E. Temiakov, I. I. Agapov, S. Saward, R. A. Palmer, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **1997**, *28*, 586-589.

- [75] A. G. Gabdoulkhakov, Y. Savochkina, N. Konareva, R. Krauspenhaar, S. Stoeva, S. V. Nikonov, W. Voelter, C. Betzel, A. M. Mikhailov, Protein Data Base: 1rzo, **2004**.
- [76] A. V. Hill, *J. Physiol.* **1910**, *40*, iv-vii.
- [77] L. D. Byers, *J. Chem. Educ.* **1977**, *54*, 352.
- [78] K. Gorska, K.-T. Huang, O. Chaloin, N. Winssinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7695-7700.
- [79] D. A. Calarese, C. N. Scanlan, M. B. Zwick, S. Deechongkit, Y. Mimura, R. Kunert, P. Zhu, M. R. Wormald, R. L. Stanfield, K. H. Roux, J. W. Kelly, P. M. Rudd, R. A. Dwek, H. Katinger, D. R. Burton, I. A. Wilson, *Science* **2003**, *300*, 2065-2071.
- [80] C. R. Cantor, P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry: Part III: The behavior of biological macromolecules*, 1. Auflage, W. H. Freeman & Company, San Francisco, **1980**, S. 850-852.
- [81] V. Wittmann, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2144-2147.
- [82] J. G. Moffatt, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 649-658.
- [83] S. C. Timmons, D. L. Jakeman, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1227-1230.
- [84] Y. Ichikawa, M. M. Sim, C. H. Wong, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2943-2946.
- [85] K. Adelhorst, G. M. Whitesides, *Carbohydr. Res.* **1993**, *242*, 69-76.
- [86] L. A. Salvador, M. Elofsson, J. Kihlberg, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 5643-5656.
- [87] M. Bergmann, L. Zervas, *Ber.* **1931**, *64*, 975-980.
- [88] U. Ellervik, G. Magnusson, *Carbohydr. Res.* **1996**, *280*, 251-260.
- [89] O. Seitz, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8766-8776.
- [90] P. Fügedi, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1986**, *149*, C9-C12.
- [91] G. E. Whitworth, M. S. Macauley, K. A. Stubbs, R. J. Dennis, E. J. Taylor, G. J. Davies, I. R. Greig, D. J. Vocadlo, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *129*, 635-644.
- [92] Y. Ichikawa, Y. C. Lin, D. P. Dumas, G.-J. Shen, E. Garcia-Junceda, M. A. Williams, R. Bayer, C. Ketcham, L. E. Walker, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9283-9298.
- [93] C. Unverzagt, H. Kunz, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9308-9309.
- [94] M. Gilbert, W. W. Wakarchuk, Patent: WO 99/49051, **1999**.
- [95] M. Gilbert, J.-R. Brisson, M.-F. Karwaski, J. Michniewicz, A.-M. Cunningham, Y. Wu, N. M. Young, W. W. Wakarchuk, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 3896-3906.
- [96] R. G. Kleinedam, T. Schmelter, R. T. Schwarz, R. Schauer, *Glycoconjugate J.* **1997**, *14*, 57-66.
- [97] D. G. Comb, D. R. Watson, S. Roseman, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 5637-5642.
- [98] S. Mehta, M. Gilbert, W. W. Wakarchuk, D. M. Whitfield, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 751-753.
- [99] S.-W. Lin, T.-M. Yuan, J.-R. Li, C.-H. Lin, *Biochemistry* **2006**, *45*, 8108-8116.
- [100] W. Hayes, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 7983-7996.
- [101] T. K. Lindhorst, S. Kötter, U. Krallmann-Wenzel, S. Ehlers, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 823-831.

- [102] T. Hasegawa, T. Fujisawa, M. Numata, T. Matsumoto, M. Umeda, R. Karinaga, M. Mizu, K. Koumoto, T. Kimura, S. Okumura, K. Sakurai, S. Shinkai, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 3091-3098.
- [103] S. Sforza, T. Tedeschi, R. Corradini, R. Marchelli, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2007, 5879-5885.
- [104] C. Dose, O. Seitz, *Org. Lett.* **2005**, 7, 4365-4368.
- [105] J. J. Wen, C. M. Crews, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 1855-1858.
- [106] R. Casale, I. S. Jensen, M. Egholm, in *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications*, 1. Auflage (Herausgeber: P. E. Nielsen, M. Egholm), Horizon Scientific Press, Wymondham, **1999**, S. 39-50.
- [107] D. E. Shafer, J. K. Inman, A. Lees, *Anal. Biochem.* **2000**, 282, 161-164.
- [108] K. Tyagarajan, E. Pretzer, J. E. Wiktorowicz, *Electrophoresis* **2003**, 24, 2348-2358.
- [109] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, *Lehrbuch der Biochemie*, 1. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, S. 773-774.
- [110] P. N. Borer, B. Dengler, I. Tinoco Jr, O. C. Uhlenbeck, *J. Mol. Biol.* **1974**, 86, 843-853.
- [111] K. Turton, R. Natesh, N. Thiyagarajan, J. A. Chaddock, K. R. Acharya, *Glycobiology* **2004**, 14, 923-929.
- [112] J. H. Naismith, C. Emmerich, J. Habash, S. J. Harrop, J. R. Helliwell, W. N. Hunter, J. Raftery, A. J. Kalb, J. Yariv, *Acta Cryst. D* **1994**, 50, 847-858.
- [113] J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14922-14933.
- [114] S. Cecioni, S. Faure, U. Darbost, I. Bonnamour, H. Parrot-Lopez, O. Roy, C. Taillefumier, M. Wimmerová, J.-P. Praly, A. Imberty, S. Vidal, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 2146-2159.
- [115] J. P. McCoy Jr, J. Varani, I. J. Goldstein, *Anal. Biochem.* **1983**, 130, 437-444.
- [116] M. Duk, E. Lisowska, J. H. Wu, A. M. Wu, *Anal. Biochem.* **1994**, 221, 266-272.
- [117] E. D. Green, G. Adelt, J. U. Baenziger, S. Wilson, H. Van Halbeek, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 18253-18268.
- [118] A. Beer, *Annal. Physik Chemie* **1852**, 86, 78-88.
- [119] J. L. Iglesias, H. Lis, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.* **1982**, 123, 247-252.
- [120] H. Lis, F. J. Joubert, N. Sharon, *Phytochemistry* **1985**, 24, 2803-2809.
- [121] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. Auflage, Springer, New York, **2006**, S. 353-382.
- [122] Invitrogen Corporation, *Fluorescence Polarization Technical Resource Guide*, 4. Auflage, **2006**, Kapitel 8.
- [123] H. De Boeck, F. G. Loontjens, H. Lis, N. Sharon, *Arch. Biochem. Biophys.* **1984**, 234, 297-304.
- [124] D. K. Mandal, C. F. Brewer, *Biochemistry* **1992**, 31, 8465-8472.
- [125] E. Kretschmann, *Z. Physik* **1971**, 241, 313-324.

- [126] F. Markey, *BIA Journal* **1999**, *1*, 14-17.
- [127] E. Duverger, N. Frison, A.-C. Roche, M. Monsigny, *Biochimie* **2003**, *85*, 167-179.
- [128] C. Scheibe, A. Bujotzek, J. Dernedde, M. Weber, O. Seitz, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 770-775.
- [129] S. R. Haseley, P. Talaga, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegthart, *Anal. Biochem.* **1999**, *274*, 203-210.
- [130] E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *143*, 513-526.
- [131] D. J. O'Shannessy, M. Brighamburke, K. K. Soneson, P. Hensley, I. Brooks, *Anal. Biochem.* **1993**, *212*, 457-468.
- [132] Biacore AB, *BIAevaluation 3.0 Software Handbook*, Version AC, **1997**, Kapitel 6-2.
- [133] K. M. Halkes, A. Carvalho de Souza, C. E. P. Maljaars, G. J. Gerwig, J. P. Kamerling, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *2005*, 3650-3659.
- [134] E. M. Munoz, J. Correa, E. Fernandez-Megia, R. Riguera, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17765-17767.
- [135] A. M. Riley, A. J. Laude, C. W. Taylor, B. V. Potter, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 278-289.
- [136] F. Abendroth, A. Bujotzek, M. Shan, R. Haag, M. Weber, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8592-8596.
- [137] Y. Gao, A. Eguchi, K. Kakehi, Y. C. Lee, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6151-6157.
- [138] C. E. Maljaars, K. M. Halkes, W. L. de Oude, S. R. Haseley, P. J. Upton, M. B. McDonnell, J. P. Kamerling, *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 812-819.
- [139] R. Gutiérrez Gallego, S. R. Haseley, V. F. L. van Miegem, J. F. G. Vliegthart, J. P. Kamerling, *Glycobiology* **2004**, *14*, 373-386.
- [140] D. Stalling, M. Westerhoff, H.-C. Hege, in *The Visualization Handbook* (Herausgeber: C. D. Hansen, C. R. Johnson), Elsevier, Burlington, Oxford, **2005**, S. 749-767.
- [141] S. Enders, G. Bernhard, A. Zakrzewicz, R. Tauber, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1770*, 1441-1449.
- [142] B. J. Hicke, S. R. Watson, A. Koenig, C. K. Lynott, R. F. Bargatze, Y. F. Chang, S. Ringquist, L. Moon-McDermott, S. Jennings, T. Fitzwater, H. L. Han, N. Varki, I. Albinana, M. C. Willis, A. Varki, D. Parma, *J. Clin. Invest.* **1996**, *98*, 2688-2692.
- [143] T. K. Kishimoto, M. A. Jutila, E. C. Butcher, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 2244-2248.
- [144] J. Dernedde, unveröffentlichte Ergebnisse, Charité - Universitätsmedizin (Berlin), **2012**.
- [145] A. Zakrzewicz, M. Gräfe, D. Terbeek, M. Bongrazio, W. Auch-Schwelk, B. Walzog, K. Graf, E. Fleck, K. Ley, P. Gaehtgens, *Blood* **1997**, *89*, 3228-3235.
- [146] M. Weinhart, D. Groger, S. Enders, S. B. Riese, J. Dernedde, R. K. Kainthan, D. E. Brooks, R. Haag, *Macromol. Biosci.* **2011**, *11*, 1088-1098.
- [147] J. Dernedde, A. Rausch, M. Weinhart, S. Enders, R. Tauber, K. Licha, M. Schirner, U. Zugel, A. von Bonin, R. Haag, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 19679-19684.

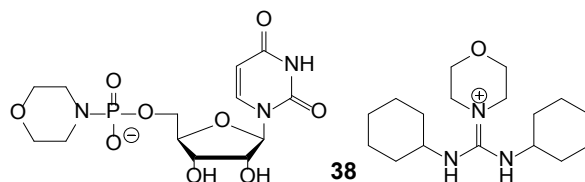
- [148] G. Kretzschmar, U. Sprengard, H. Kunz, E. Bartnik, W. Schmidt, A. Toepfer, B. Hörsch, M. Krause, D. Seiffge, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 13015-13030.
- [149] G. Baisch, R. Öhrlein, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1812-1815.
- [150] M. Roskamp, S. Enders, F. Pfengle, S. Yekta, V. Dekaris, J. Dervede, H. U. Reissig, S. Schlecht, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7448-7456.
- [151] P. E. Nielsen, G. Haaima, A. Lohse, O. Buchardt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1939-1942.
- [152] A. Püschl, S. Sforza, G. Haaima, O. Dahl, P. E. Nielsen, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4707-4710.
- [153] D. M. J. Lilley, *Q. Rev. Biophys.* **2000**, *33*, 109-159.
- [154] D. E. Gilbert, J. Feigon, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 305-314.
- [155] E. A. Englund, D. Wang, H. Fujigaki, H. Sakai, C. M. Micklitsch, R. Ghirlando, G. Martin-Manso, M. L. Pendrak, D. D. Roberts, S. R. Durell, D. H. Appella, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 614.
- [156] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- [157] C. R. Cantor, M. M. Warshaw, H. Shapiro, *Biopolymers* **1970**, *9*, 1059-1077.
- [158] M. J. Cavalluzzi, P. N. Borer, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e13.
- [159] R. P. Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, 9. Auflage, Molecular Probes Inc., Eugene, **2002**, S. 46-56.
- [160] T. S. Thomas, S. L. Li Steven, *Eur. J. Biochem.* **1980**, *105*, 453-459.
- [161] A. Kyras, M. Feigl, *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 2375-2396.
- [162] H. Harada, O. Asano, T. Kawata, T. Inoue, T. Horio, N. Yasuda, K. Nagata, M. Murakami, J. Nagaoka, S. Kobayashi, I. Tanaka, S. Abe, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2709-2726.
- [163] M. Ravenscroft, R. M. G. Roberts, J. G. Tillett, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1982**, 1569-1572.
- [164] D. H. Rich, P. D. Gesellchen, A. Tong, A. Cheung, C. K. Buckner, *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 1004-1010.
- [165] O. Keller, J. Rudinger, *Helv. Chim. Acta* **1975**, *58*, 531-541.
- [166] R. Bukowski, Laura M. Morris, Robert J. Woods, T. Weimar, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 2697-2705.
- [167] M. Dowlut, D. G. Hall, O. Hindsgaul, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9809-9813.
- [168] S.-j. Hou, R. Saksena, P. Kováč, *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 196-210.
- [169] W. Wang, L. Li, C. Jin, Y. Niu, S. Li, J. Ma, L. Li, Y. Liu, L. Cai, W. Zhao, P. G. Wang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5041-5044.
- [170] M. C. de Koning, L. Petersen, J. J. Weterings, M. Overhand, G. A. van der Marel, D. V. Filippov, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 3248-3258.
- [171] K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5767-5773.

- [172] H. Mutolsky, A. Christopoulos, *Fitting Models to Biological Data using Linear and Nonlinear Regression - A practical guide to curve fitting*, Graphpad Software Inc., San Diego, **2003**, S. 315-316.
- [173] S. Enders, Dissertation, Freie Universität Berlin (Berlin), **2007**.
- [174] D. A. Case, T. E. Cheatham, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Merz, A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang, R. J. Woods, *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1668-1688.
- [175] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157-1174.
- [176] J. Wang, W. Wang, P. A. Kollman, D. A. Case, *J. Mol. Graph. Mod.* **2006**, *25*, 247-260.
- [177] V. Hornak, R. Abel, A. Okur, B. Strockbine, A. Roitberg, C. Simmerling, *Proteins* **2006**, *65*, 712-725.
- [178] A. Jakalian, B. L. Bush, D. B. Jack, C. I. Bayly, *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 132-146.
- [179] A. Jakalian, D. B. Jack, C. I. Bayly, *J. Comput. Chem.* **2002**, *23*, 1623-1641.
- [180] B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, E. Lindahl, *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 435-447.
- [181] E. J. Sorin, V. S. Pande, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 2472-2493.
- [182] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein, *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926-935.
- [183] G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello, *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 014101-014107.
- [184] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, J. R. Haak, *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684-3690.
- [185] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L. G. Pedersen, *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 8577-8593.
- [186] B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, J. G. E. M. Fraaije, *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1463-1472.

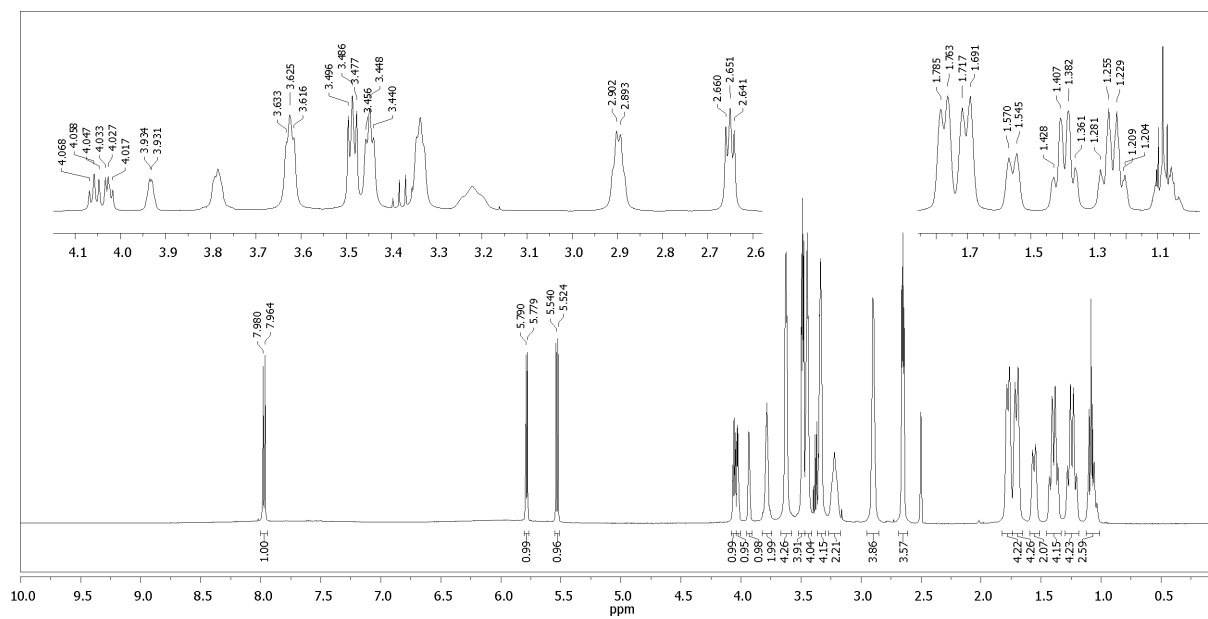
8. ANHANG

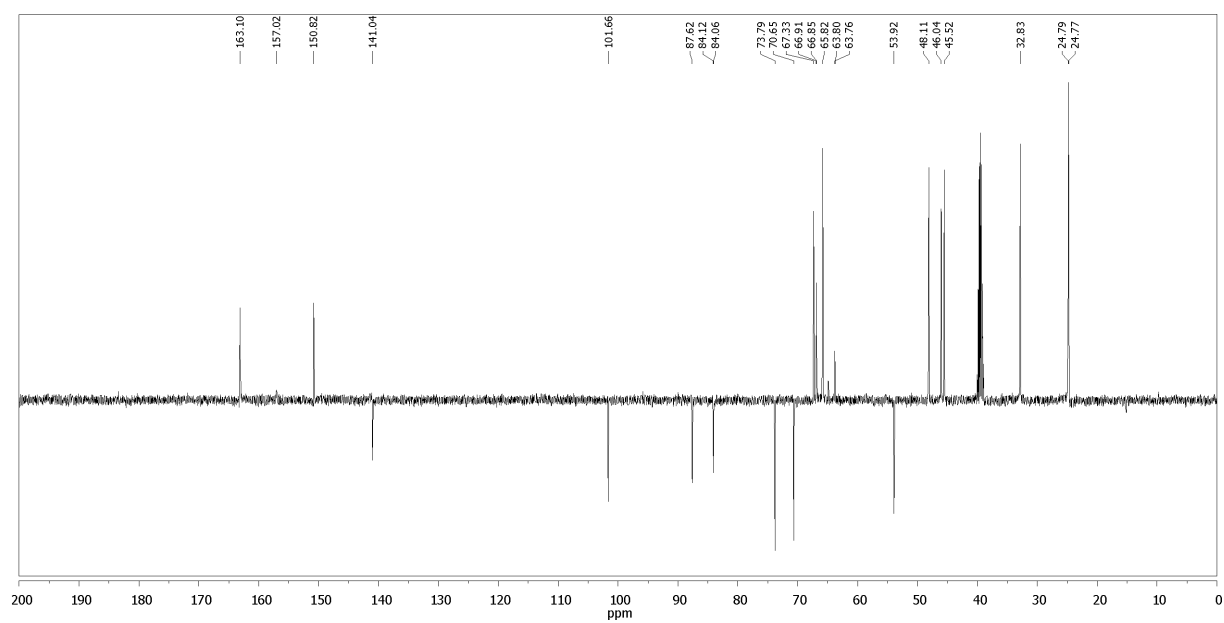
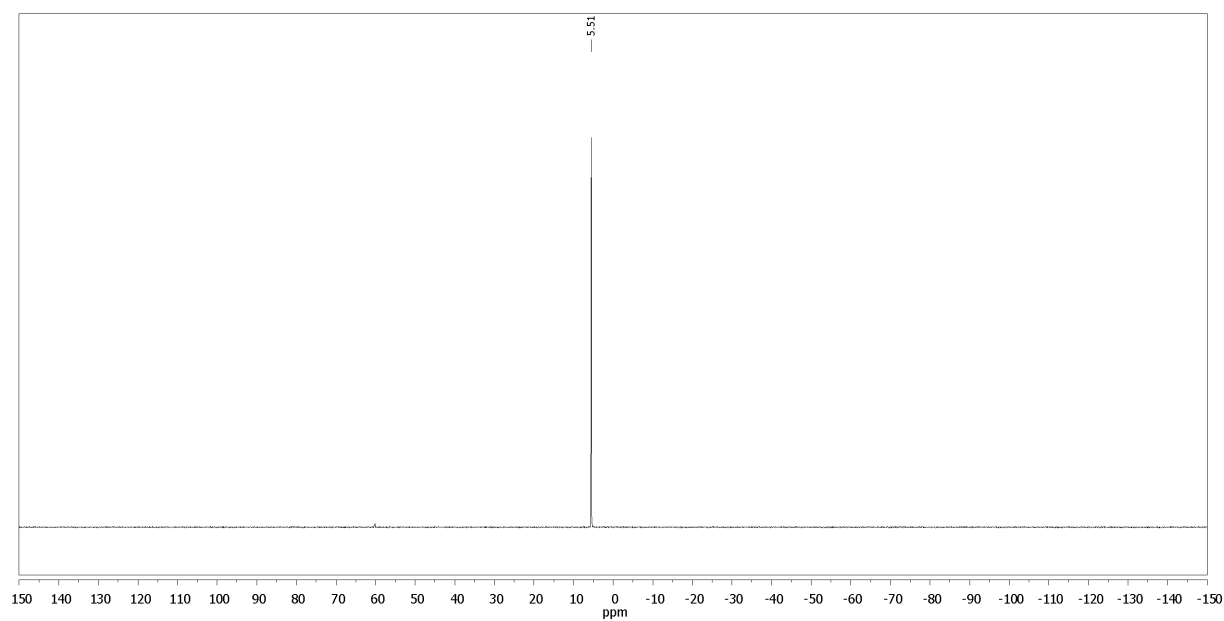
8.1 NMR-Spektren

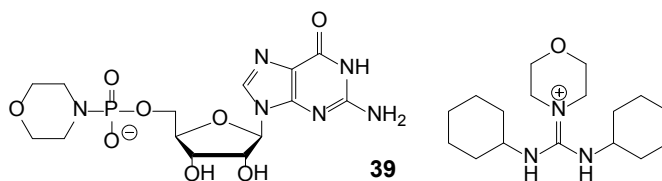
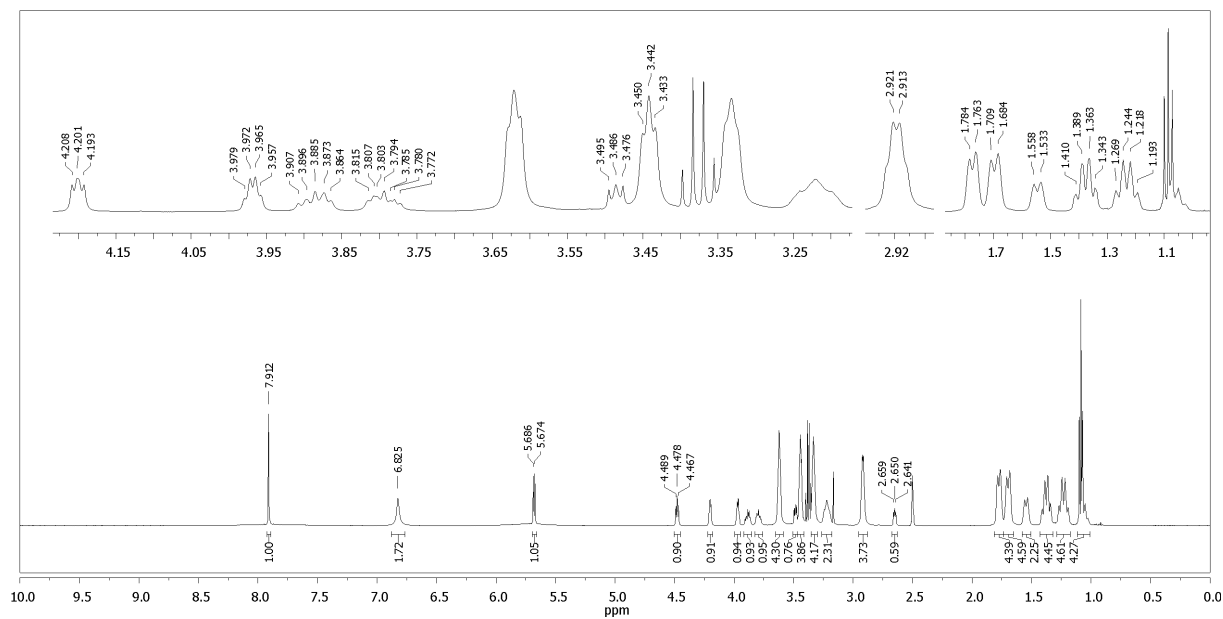
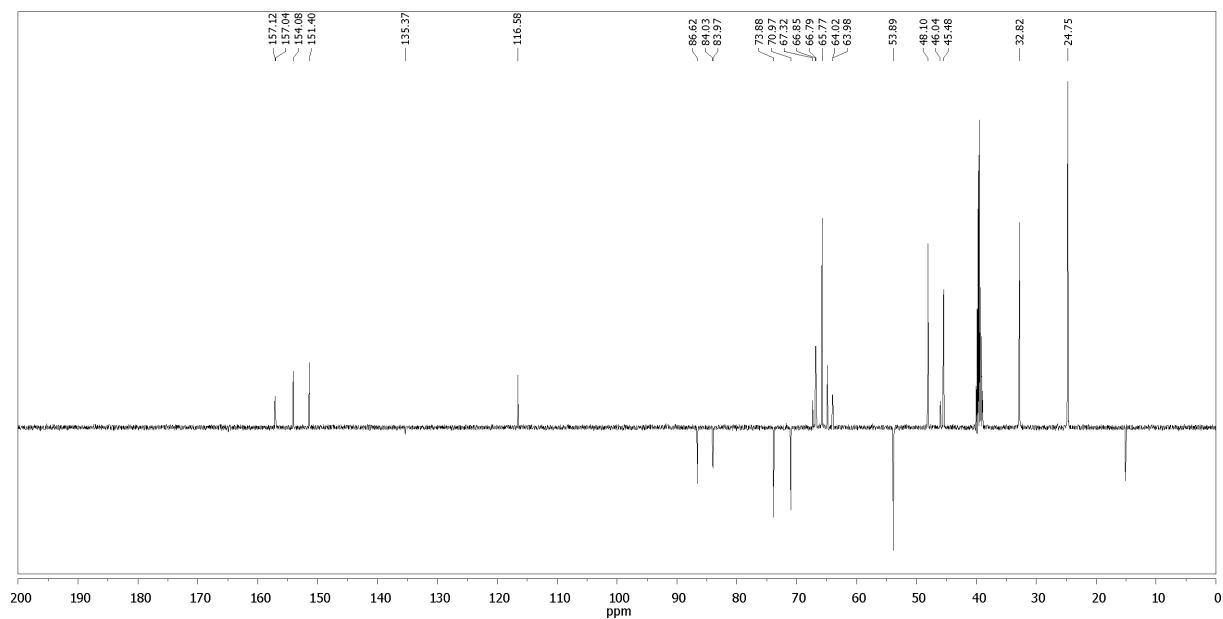
Uridin-5'-monophosphomorpholidat-4-Morpholin-*N,N'*-dicyclohexylcarboxamidinsalz (38)



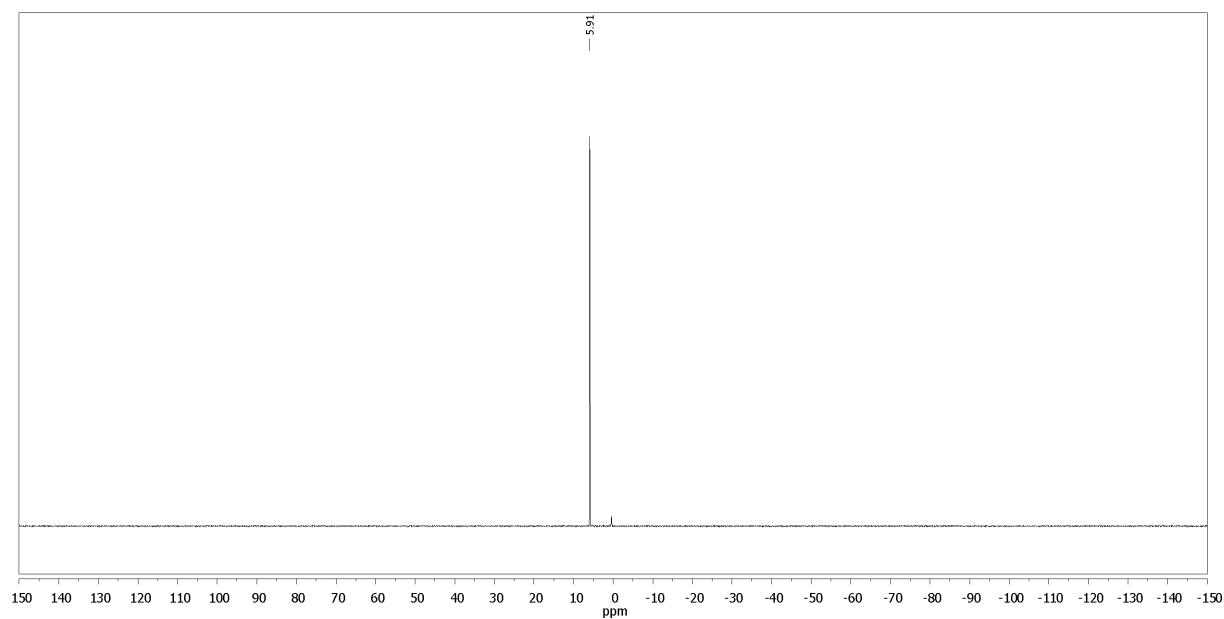
^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO- d_6):



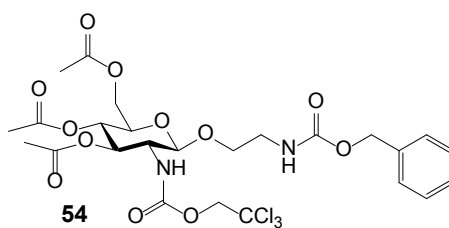
APT-Spektrum (126 MHz, DMSO-d₆):³¹P-NMR-Spektrum (202 MHz, DMSO-d₆):

Guanosin-5'-monophosphomorpholidat-4-Morpholin-*N,N'*-dicyclohexylcarboxamidinsalz (39)¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d₆):APT-Spektrum (126 MHz, DMSO-d₆):

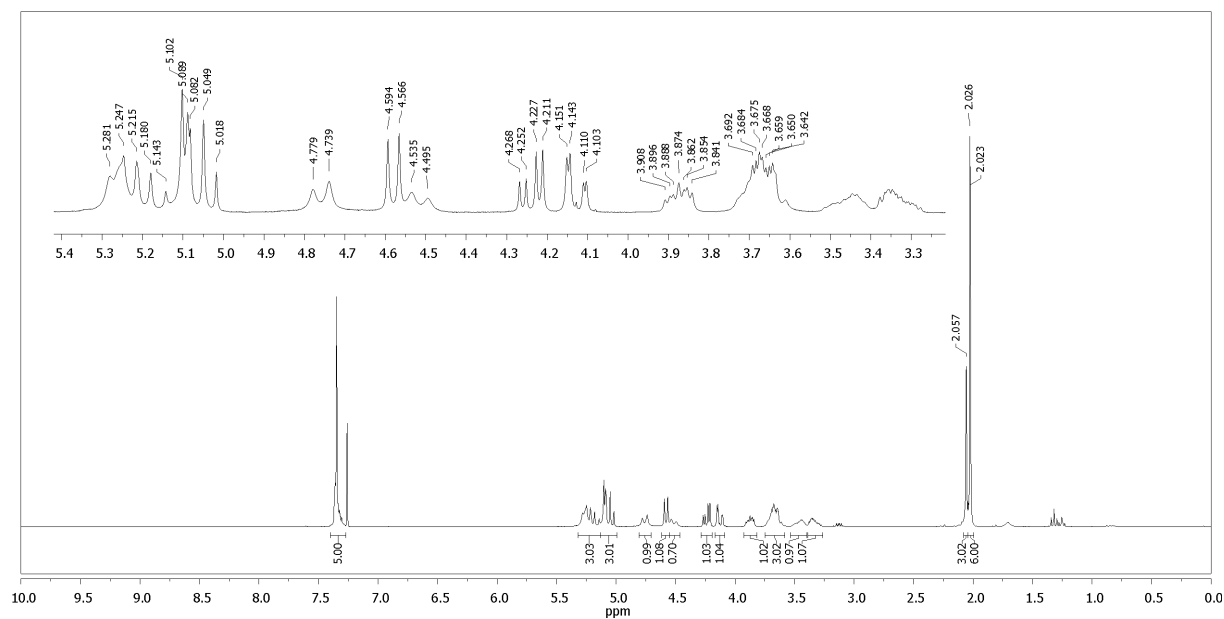
^{31}P -NMR-Spektrum (202 MHz, DMSO-d_6):

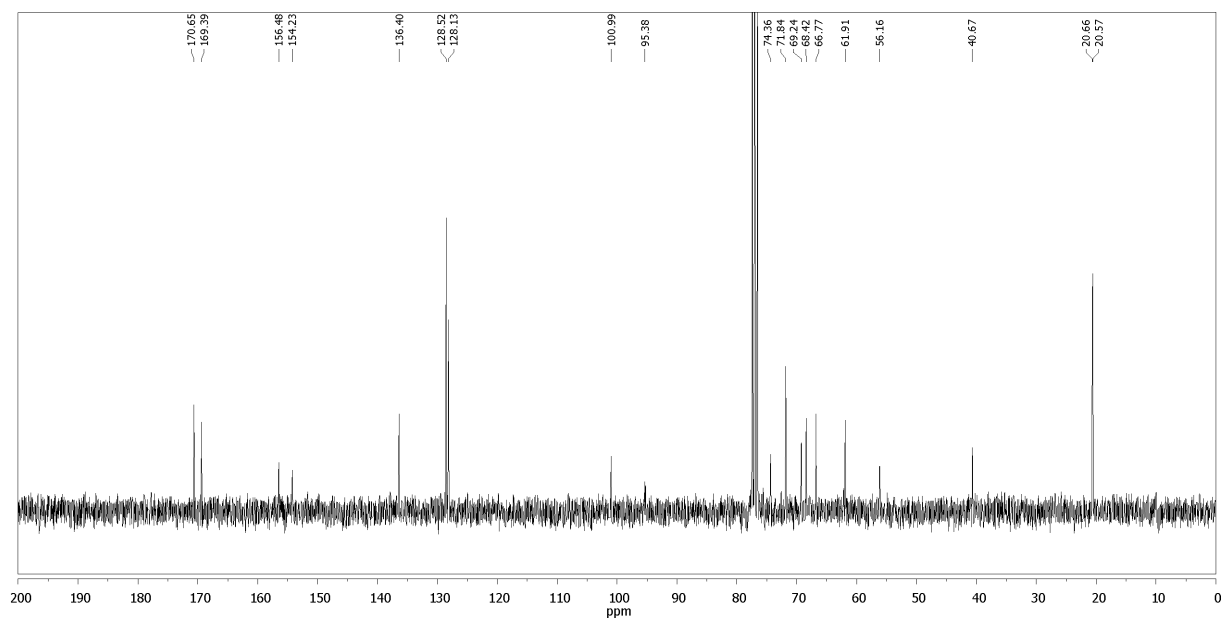
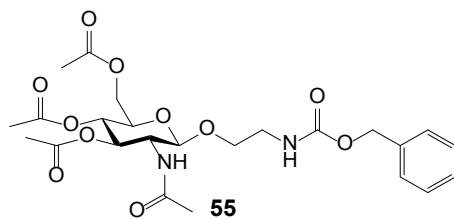
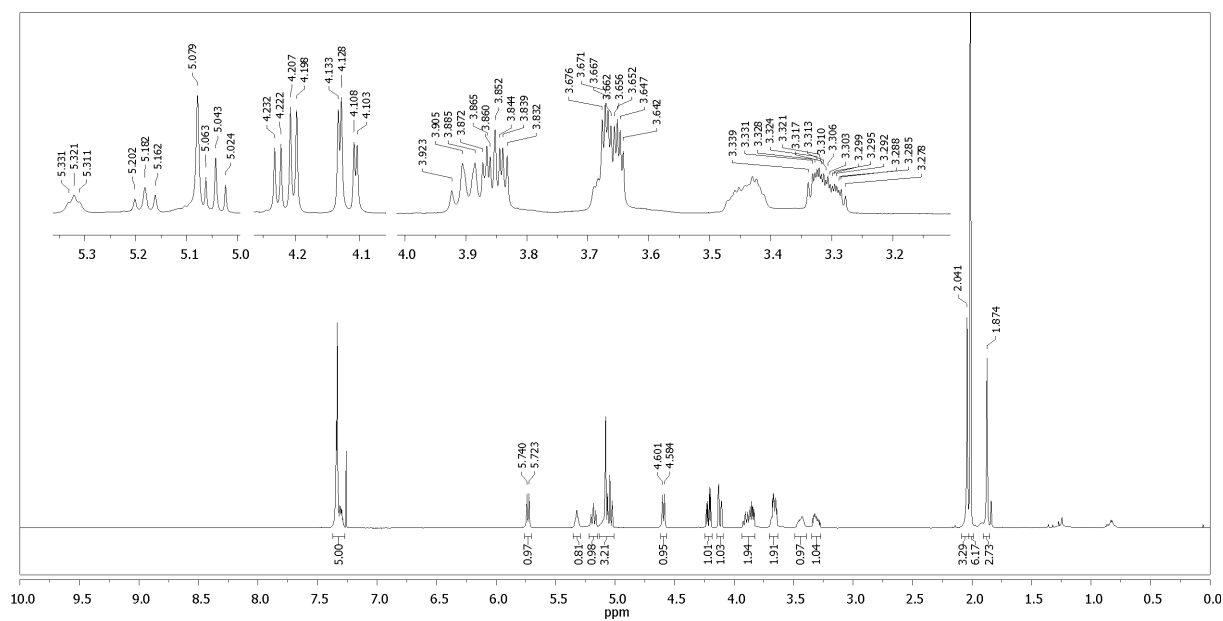


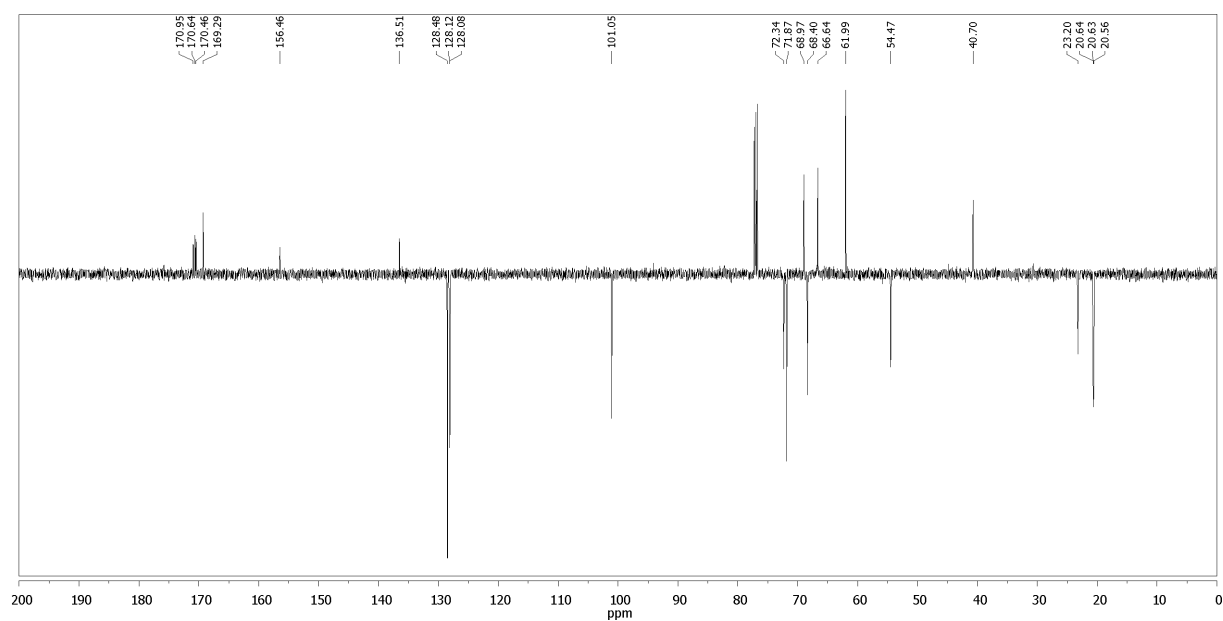
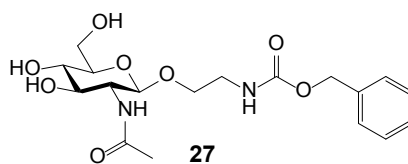
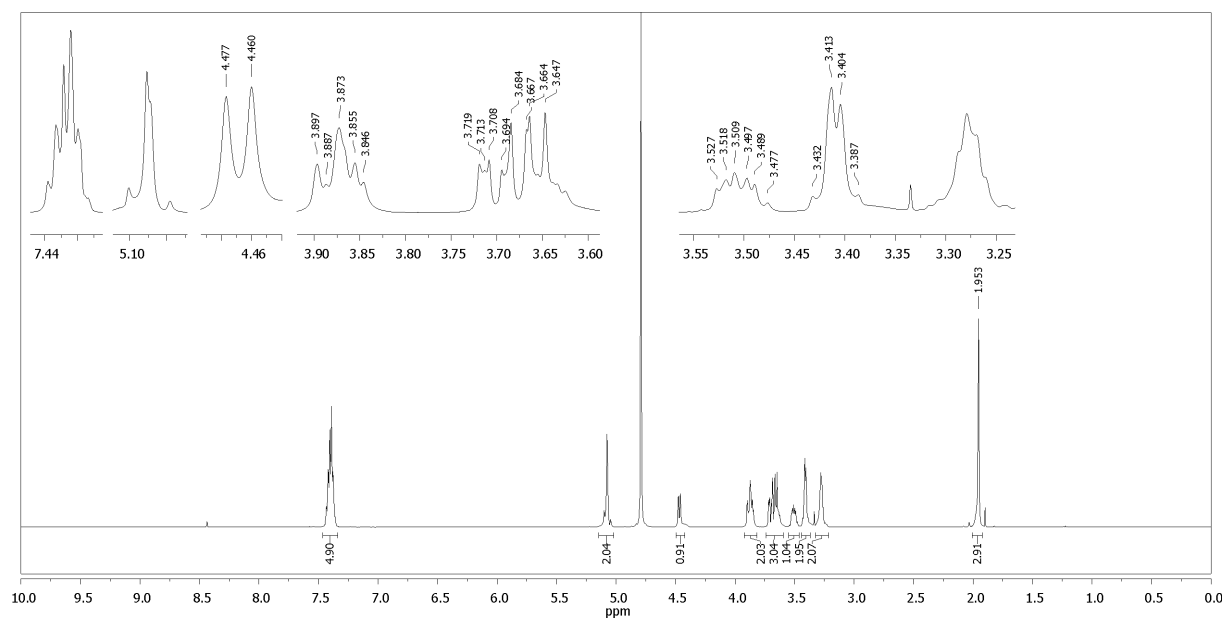
(*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)-3,4,6-tri-*O*-acetyl-*N*-(2,2,2-trichloroethyloxycarbonyl)- β -D-glucosaminid (54**)**



^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl_3):

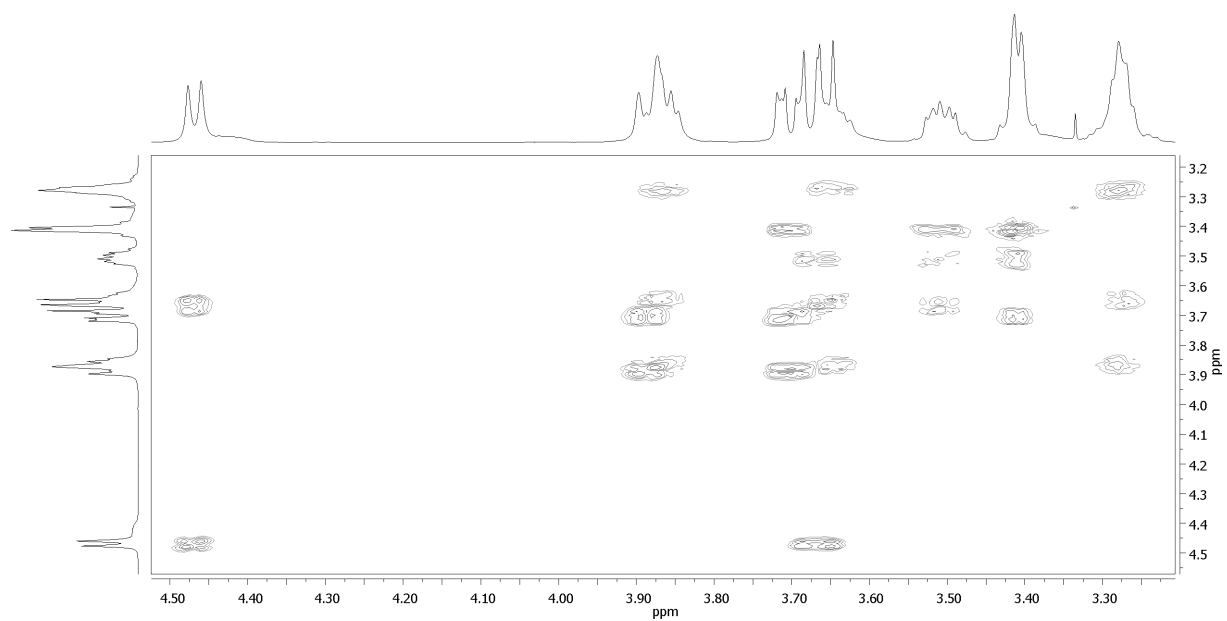


^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz, CDCl_3):*(N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)-3,4,6-tri-*O*-acetyl-*N*-acetyl- β -D-glucosaminid (**55**) ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, CDCl_3):

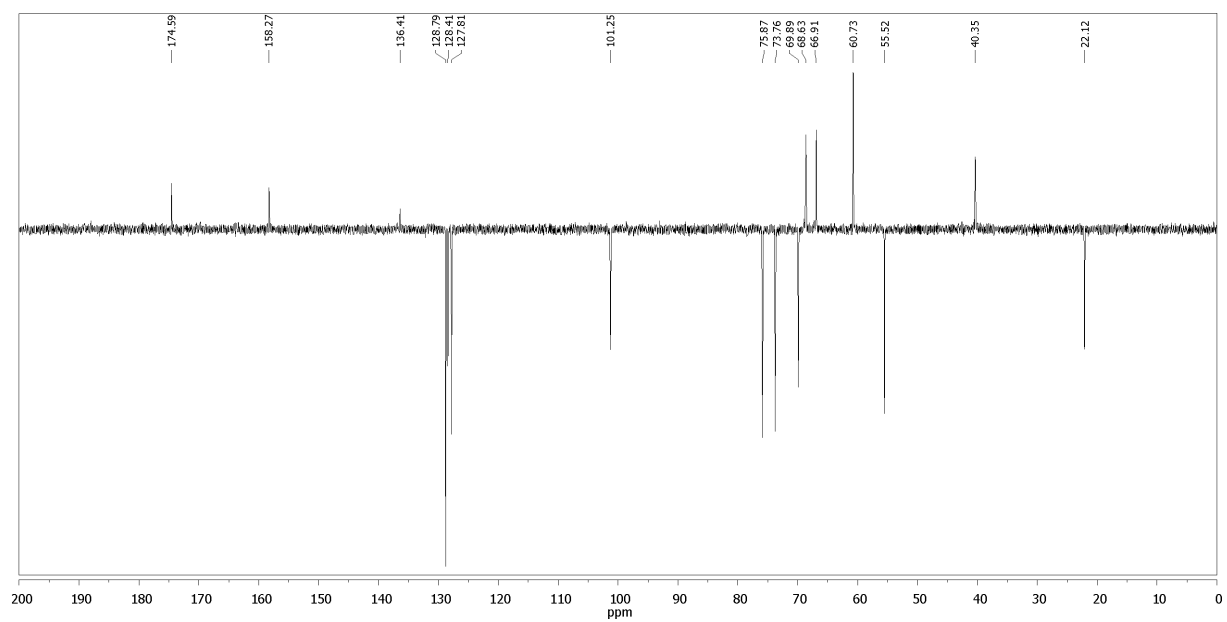
APT-Spektrum (126 MHz, CDCl₃):**(*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)-*N*-acetyl- β -D-glucosaminid (27)**¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, D₂O):

8. Anhang

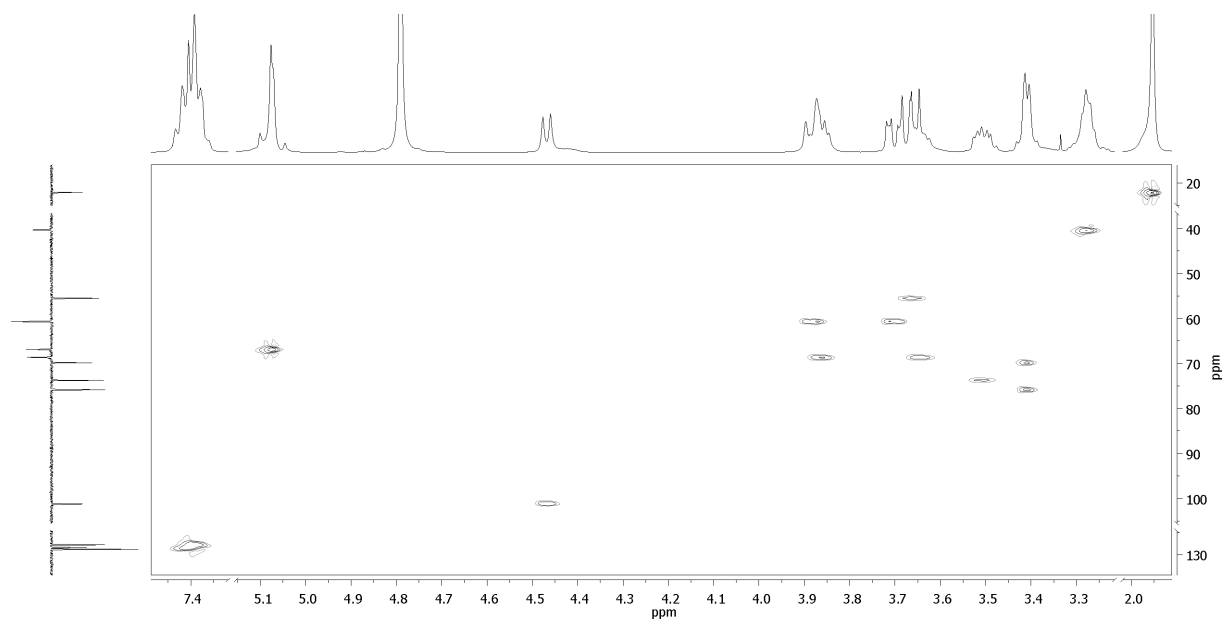
$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (500 MHz, D_2O):



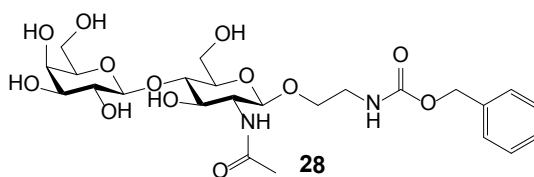
APT-Spektrum (126 MHz, D_2O):



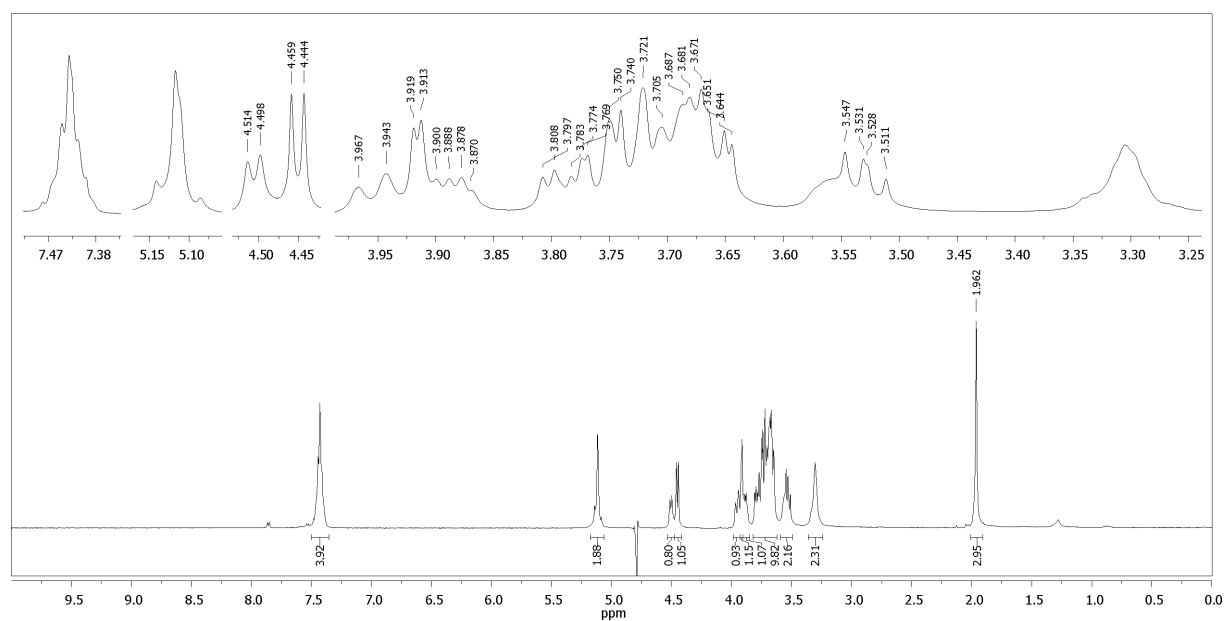
HSQC-Spektrum (500/126 MHz, D₂O):



(*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)-*N*-acetyl- β -D-lactosaminid (28**)**

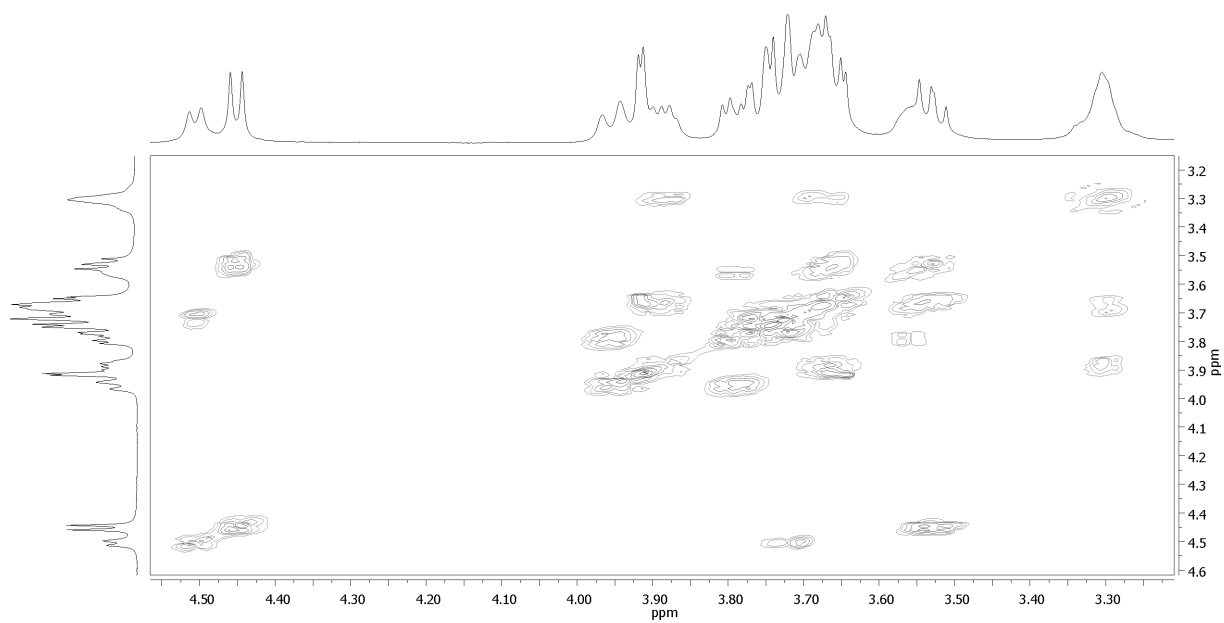


¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, D₂O):

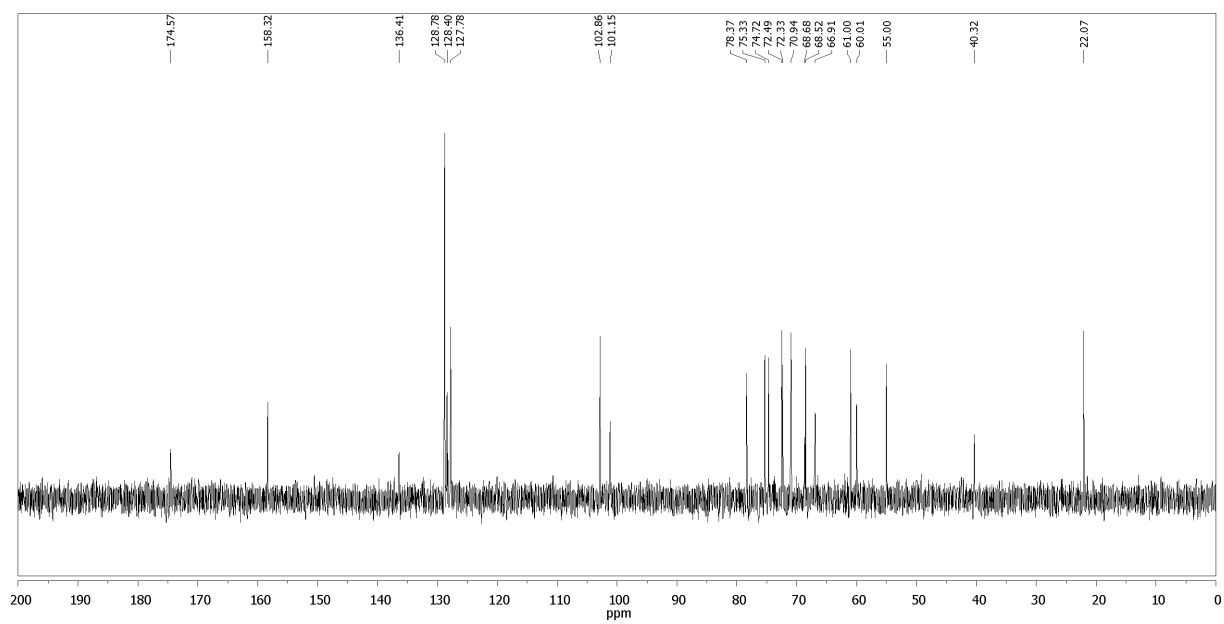


8. Anhang

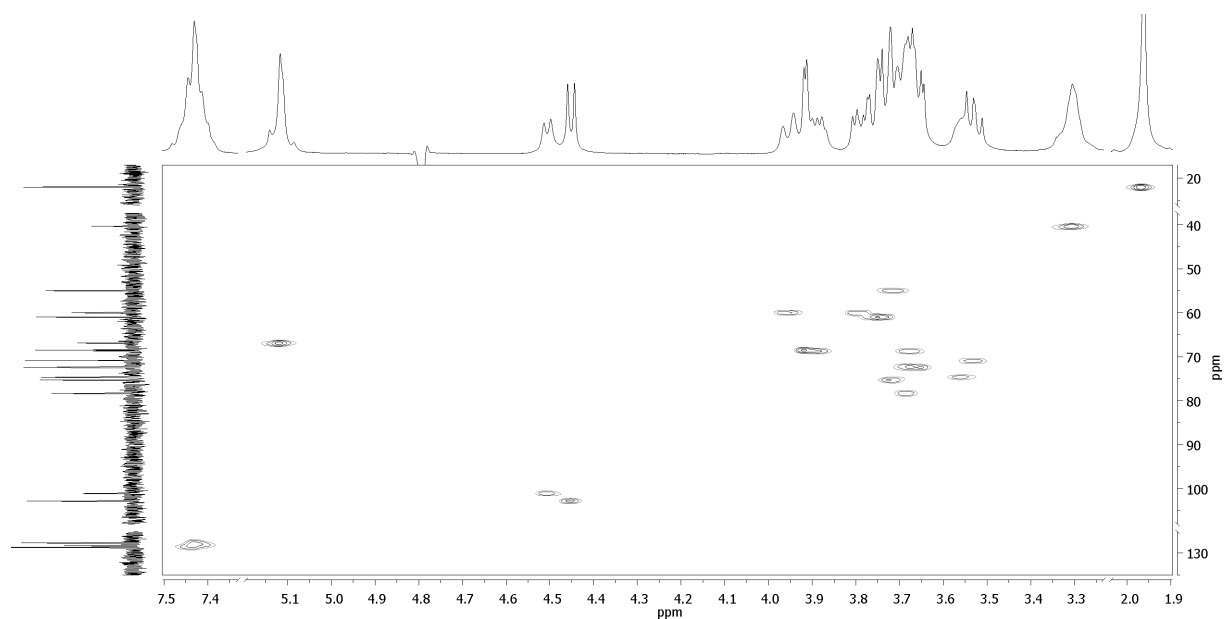
$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (500 MHz, D_2O):



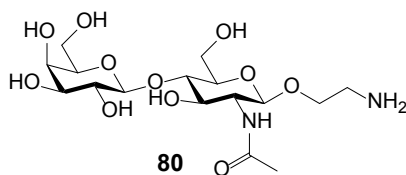
^{13}C -NMR-Spektrum (126 MHz, D_2O):



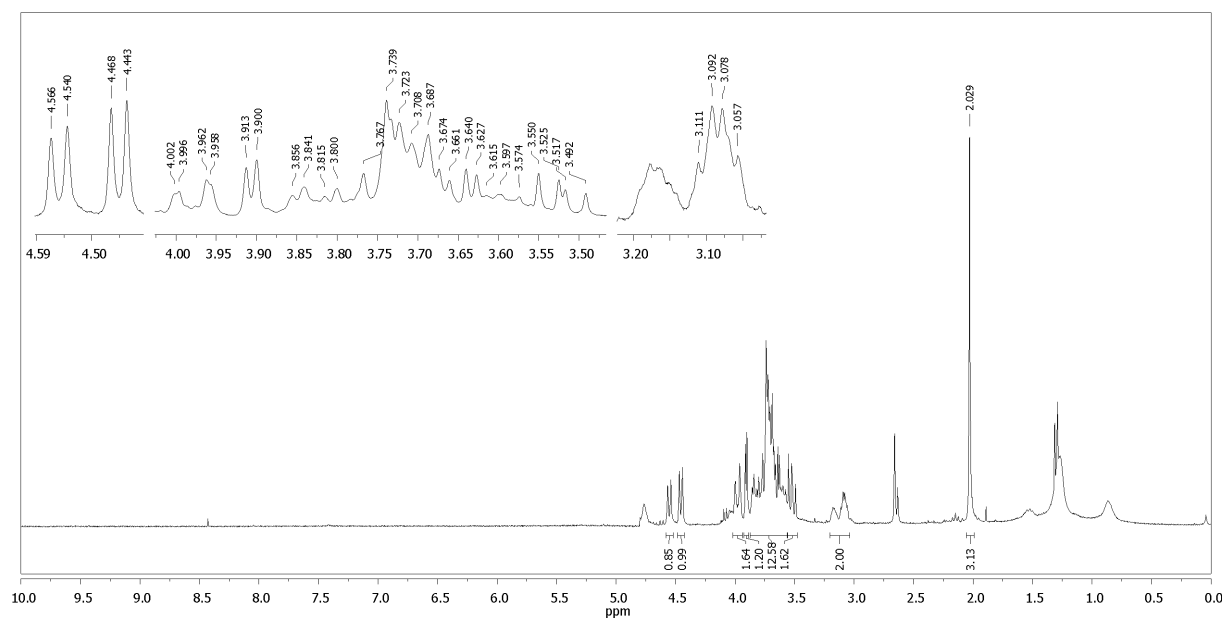
HSQC-Spektrum (500/126 MHz, D₂O):



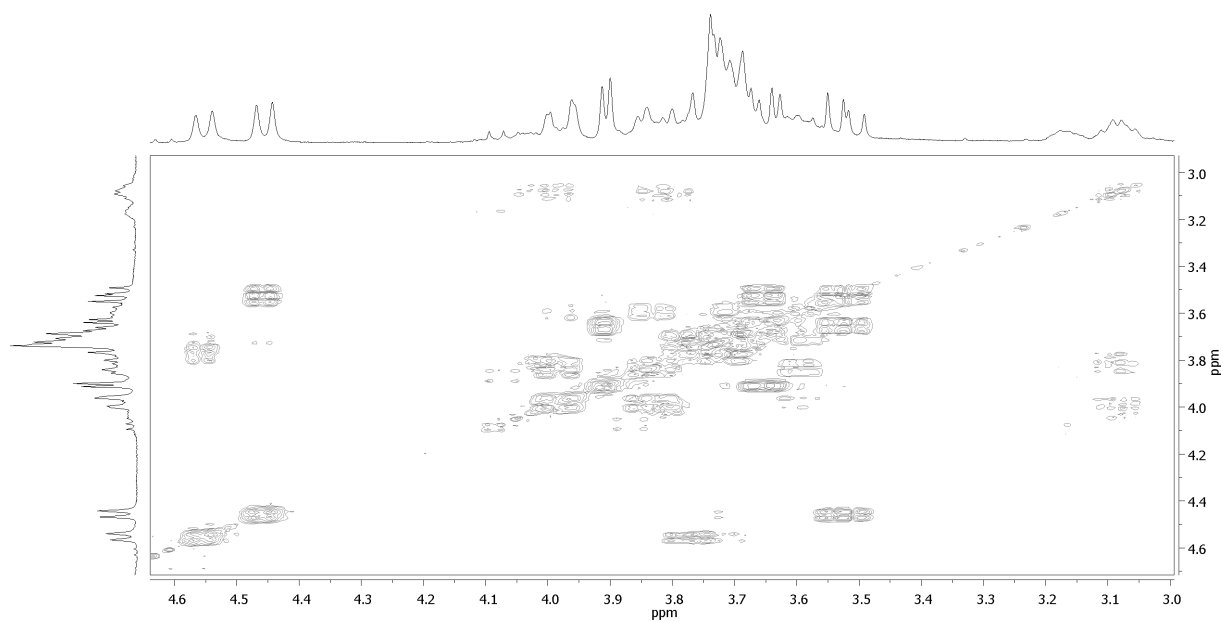
(2-Aminoethyl)-*N*-acetyl- β -D-lactosaminid (**80**)



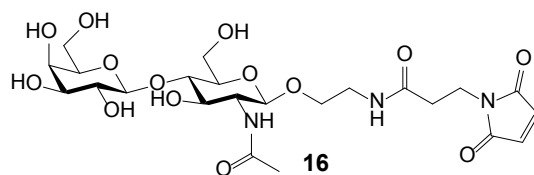
¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, D₂O):



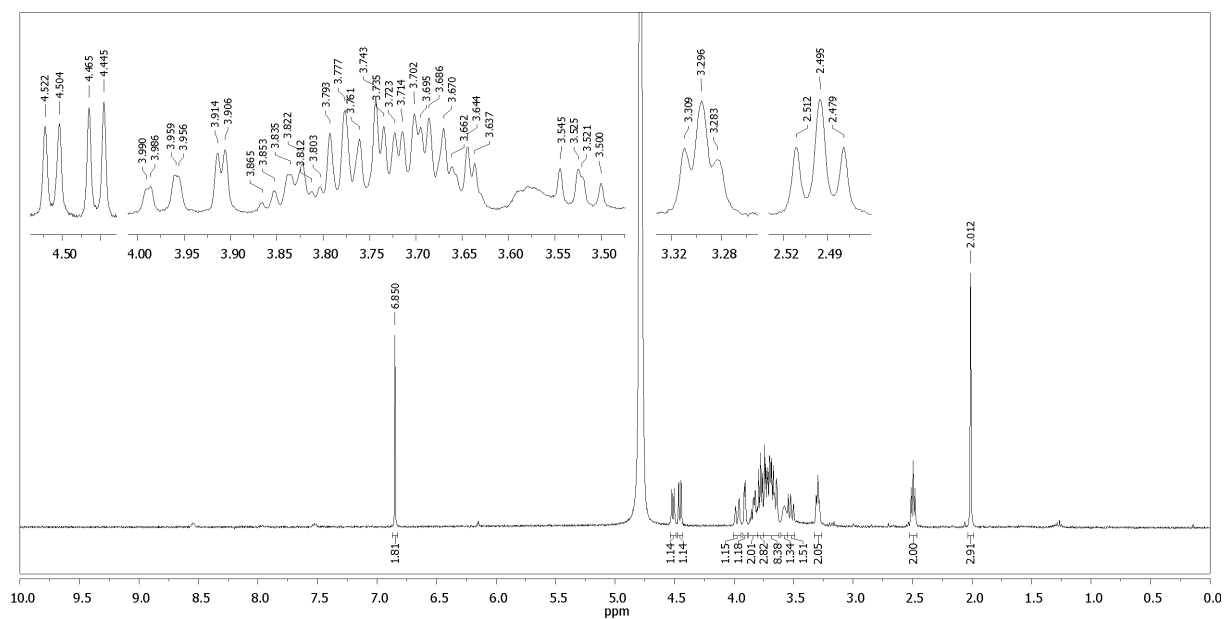
$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (300 MHz, D_2O):

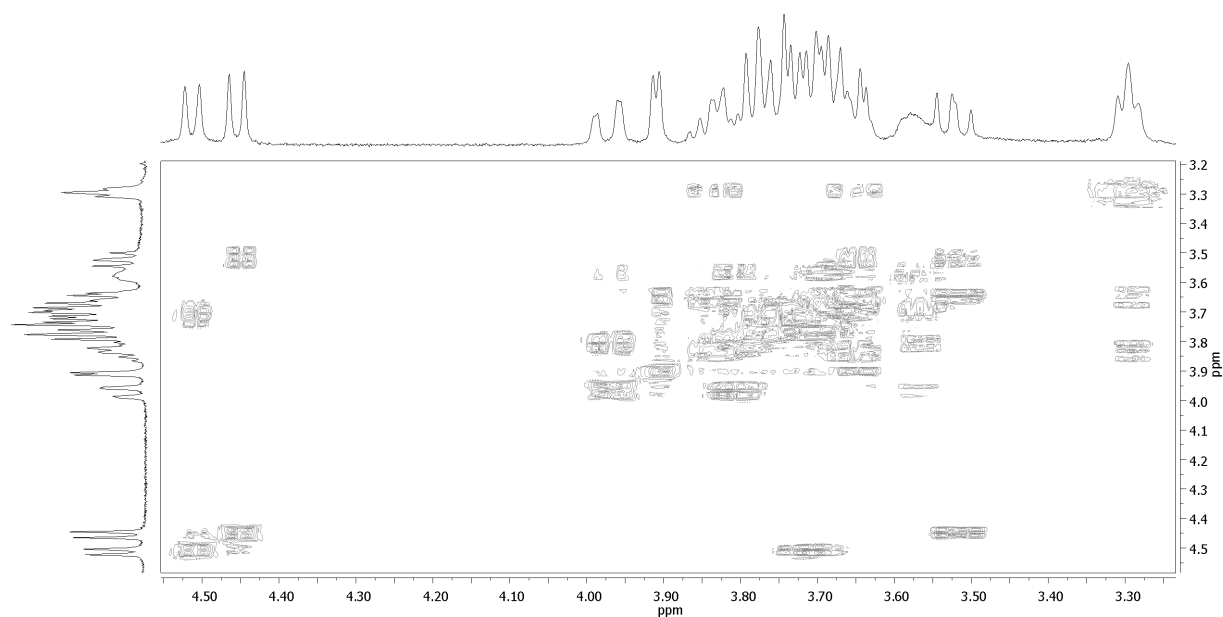


(*N*-(3'-Maleimidopropanoyl)-2-aminoethyl)-*N*-acetyl- β -D-lactosaminid (16)

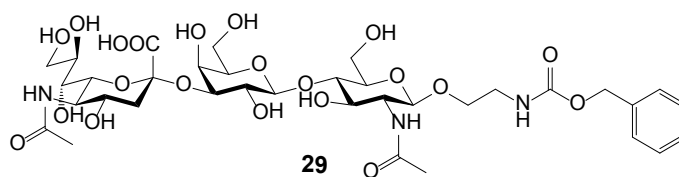
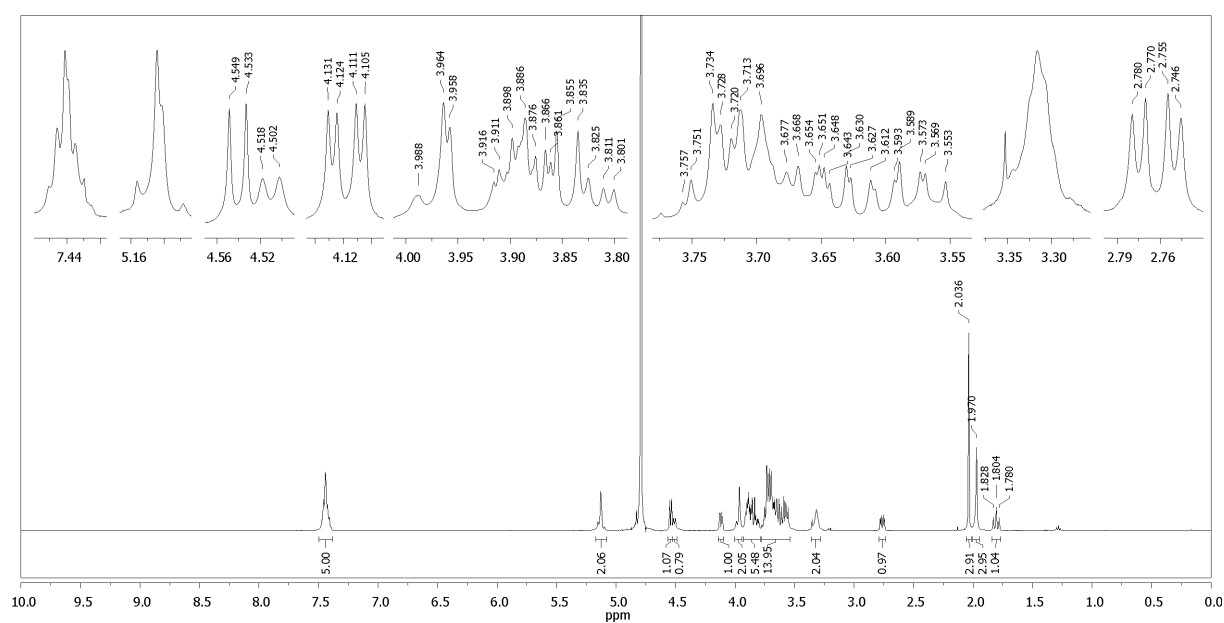


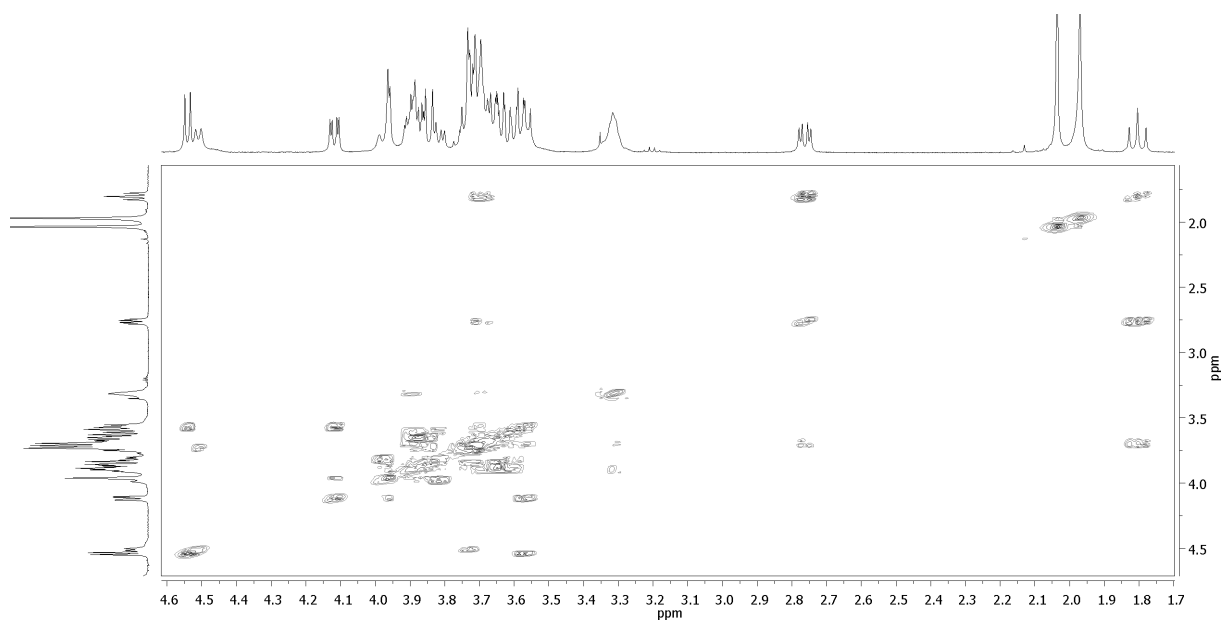
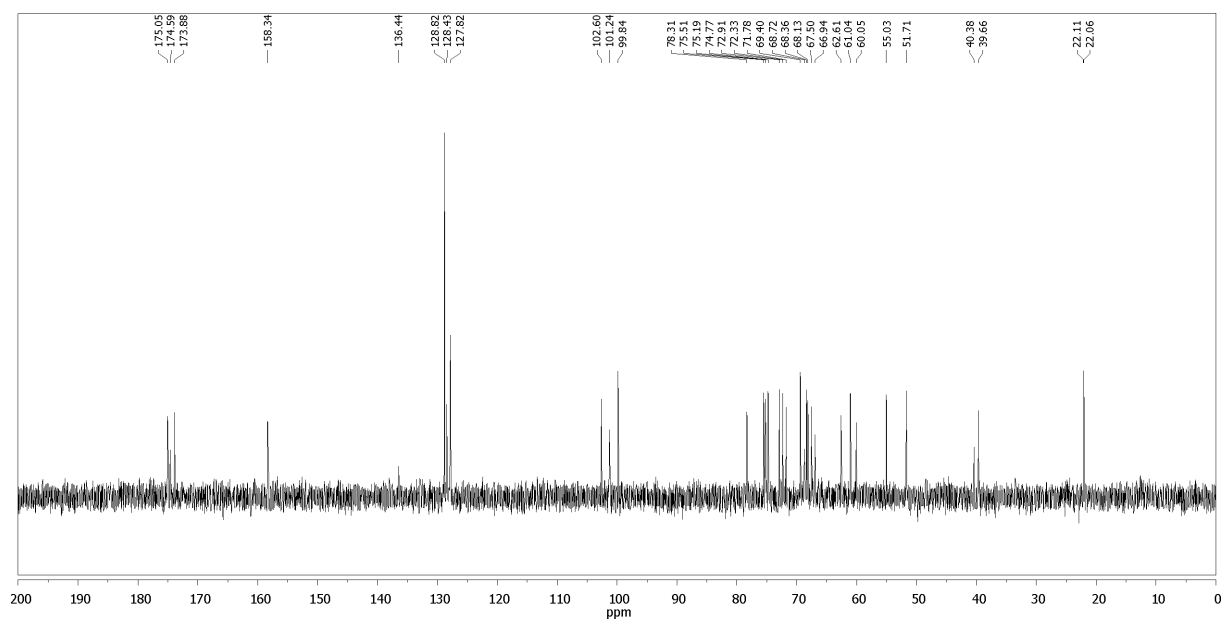
^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, D_2O):

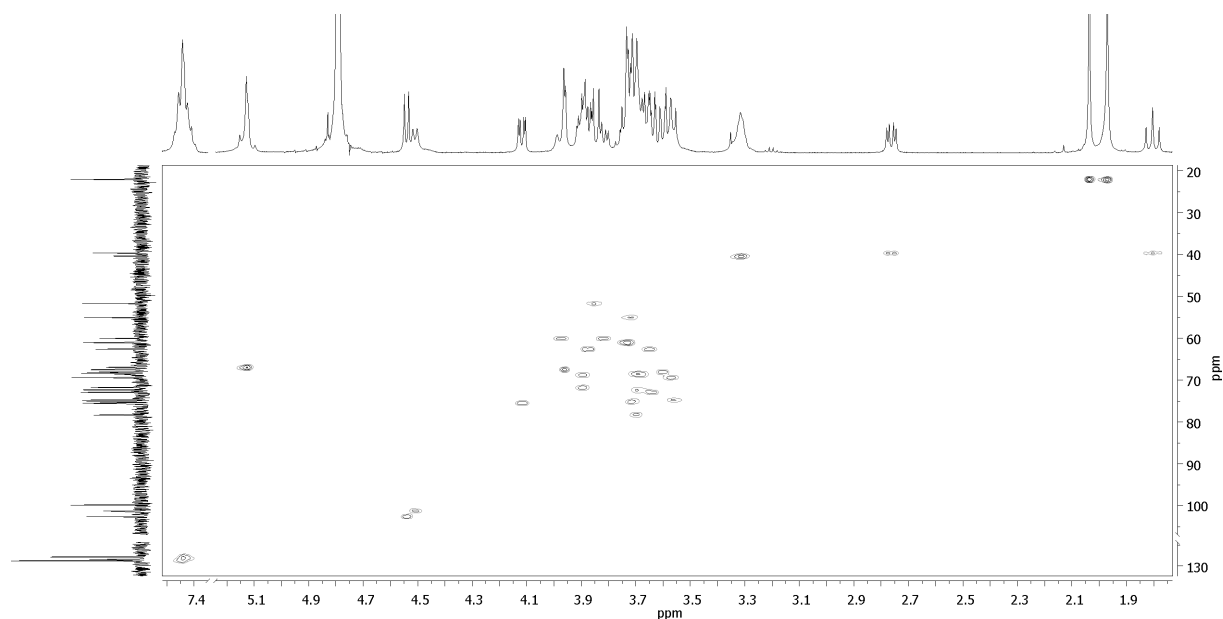


^1H , ^1H -COSY-Spektrum (400 MHz, D_2O):

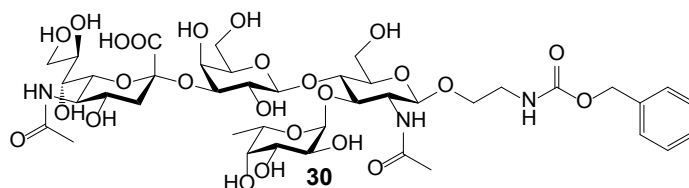
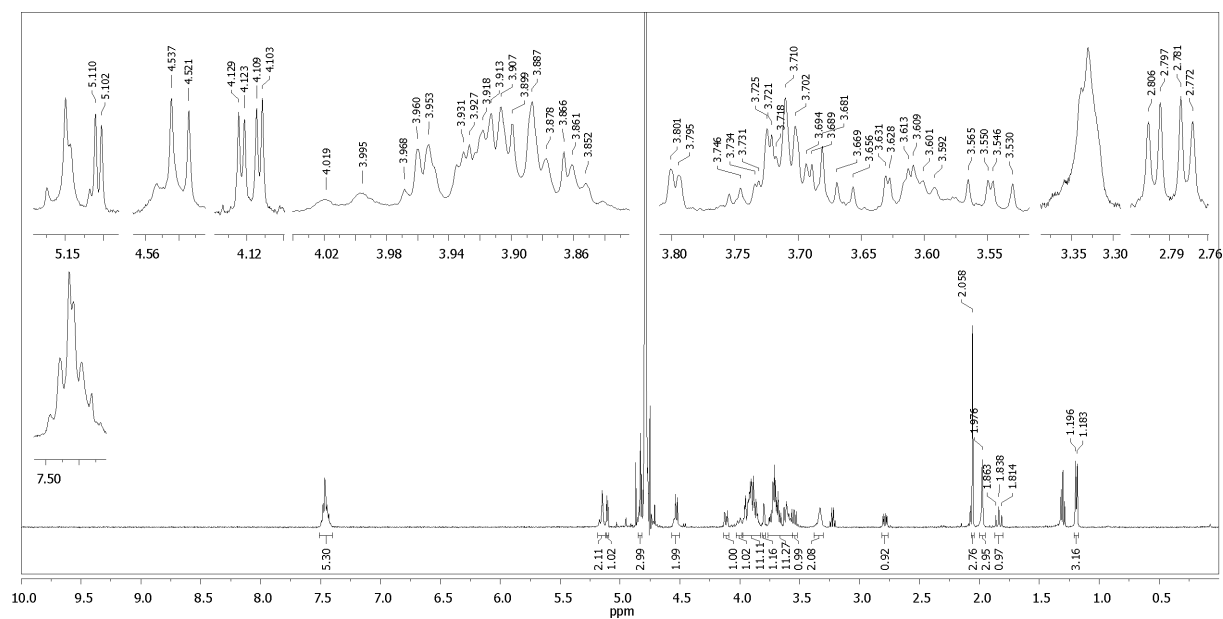
(*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)- α -sialyl-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)-*N*-acetyl- β -D-glucosaminid (29)

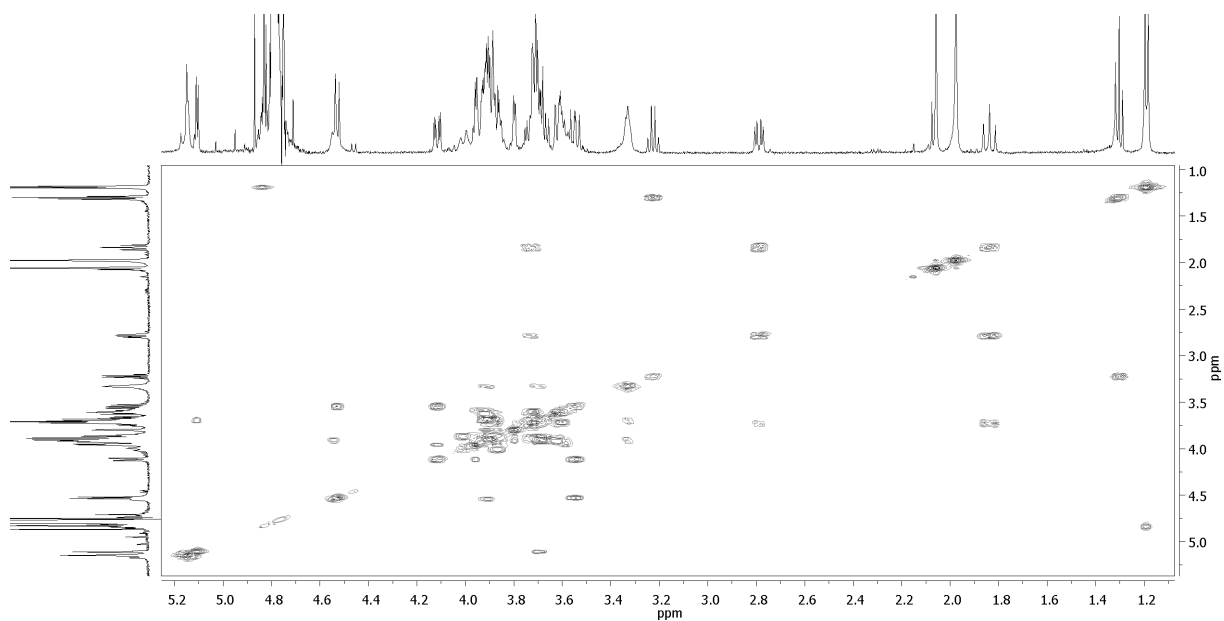
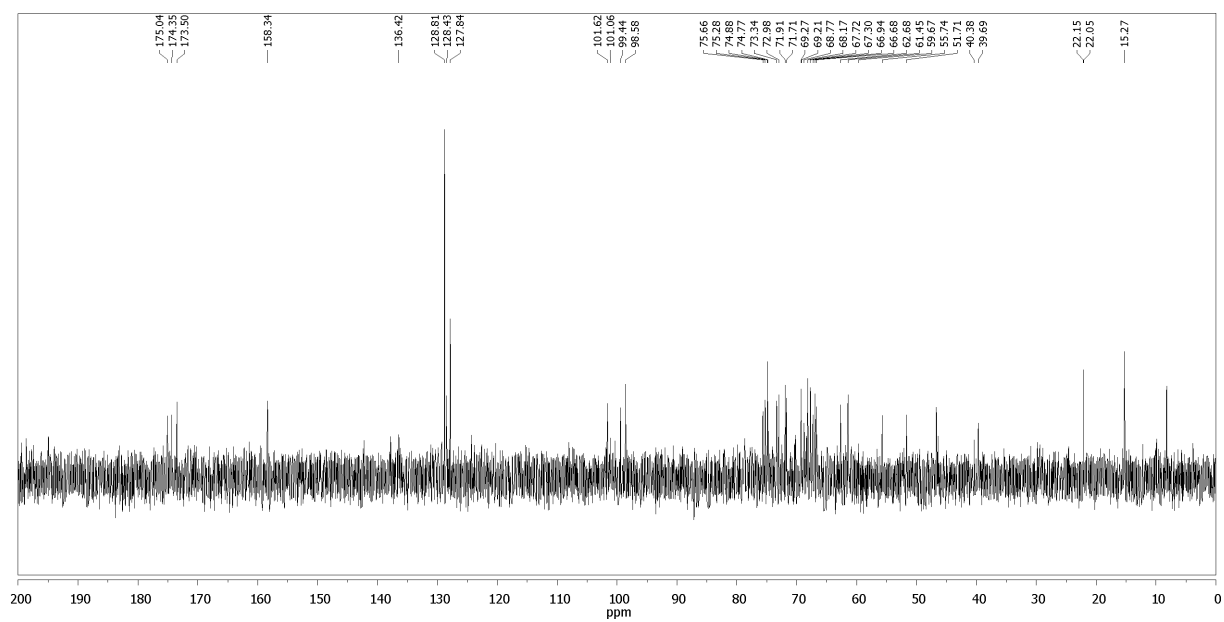
 ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, D_2O):

$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (500 MHz, D_2O): ^{13}C -NMR-Spektrum (126 MHz, D_2O):

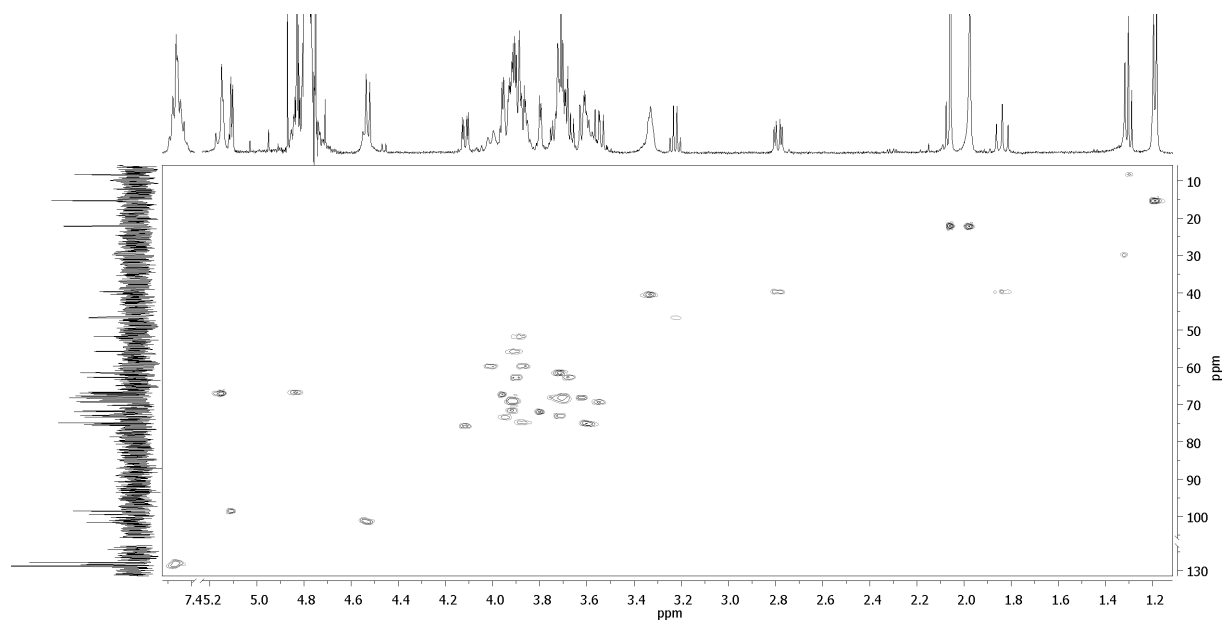
HSQC-Spektrum (500/126 MHz, D₂O):

(*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)- α -sialyl-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -L-fucosyl-(1 \rightarrow 3)]-*N*-acetyl- β -D-glucosaminid (30**)**

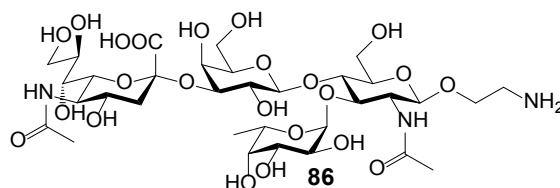
¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, D₂O):

$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (500 MHz, D_2O): ^{13}C -NMR-Spektrum (126 MHz, D_2O):

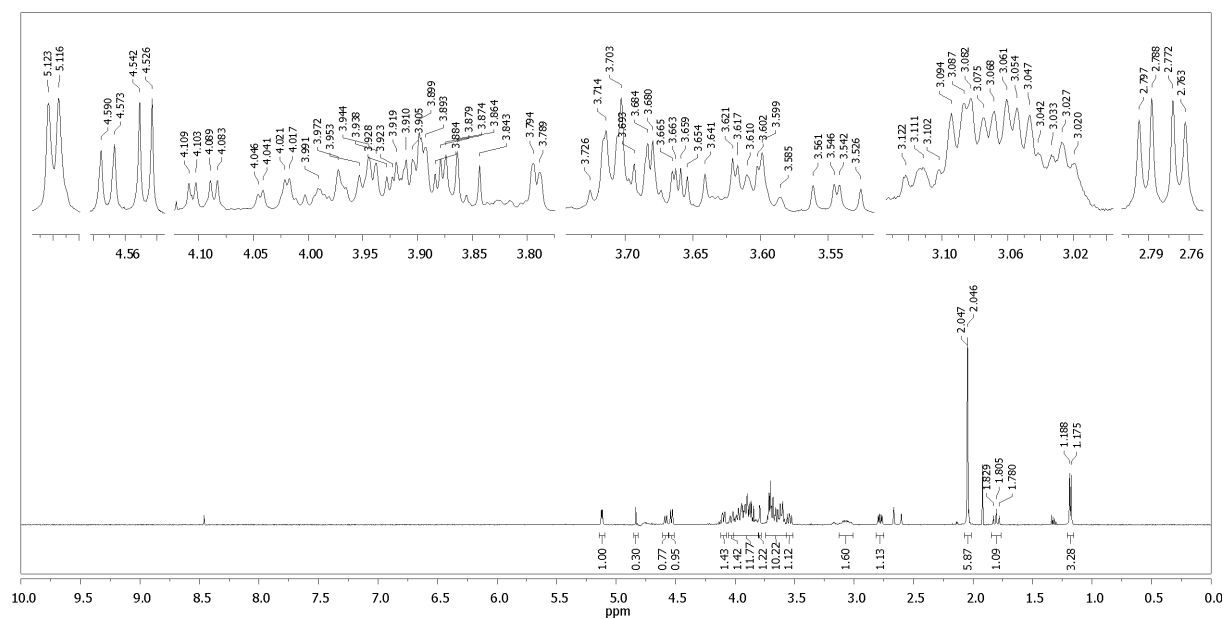
HSQC-Spektrum (500/126 MHz, D₂O):

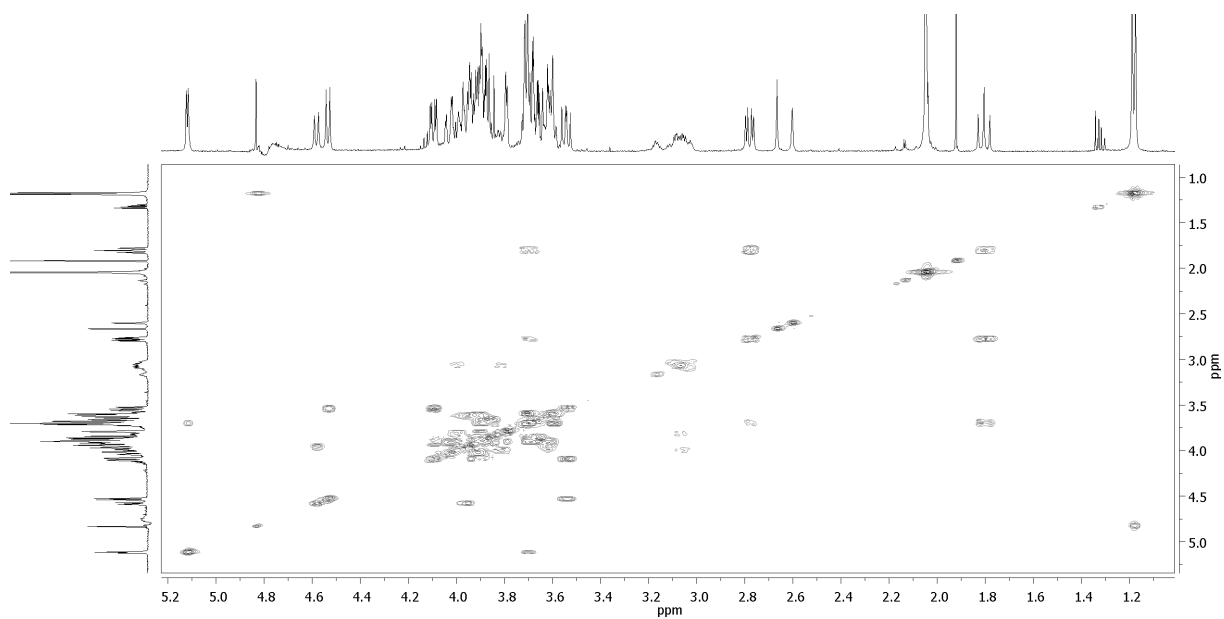
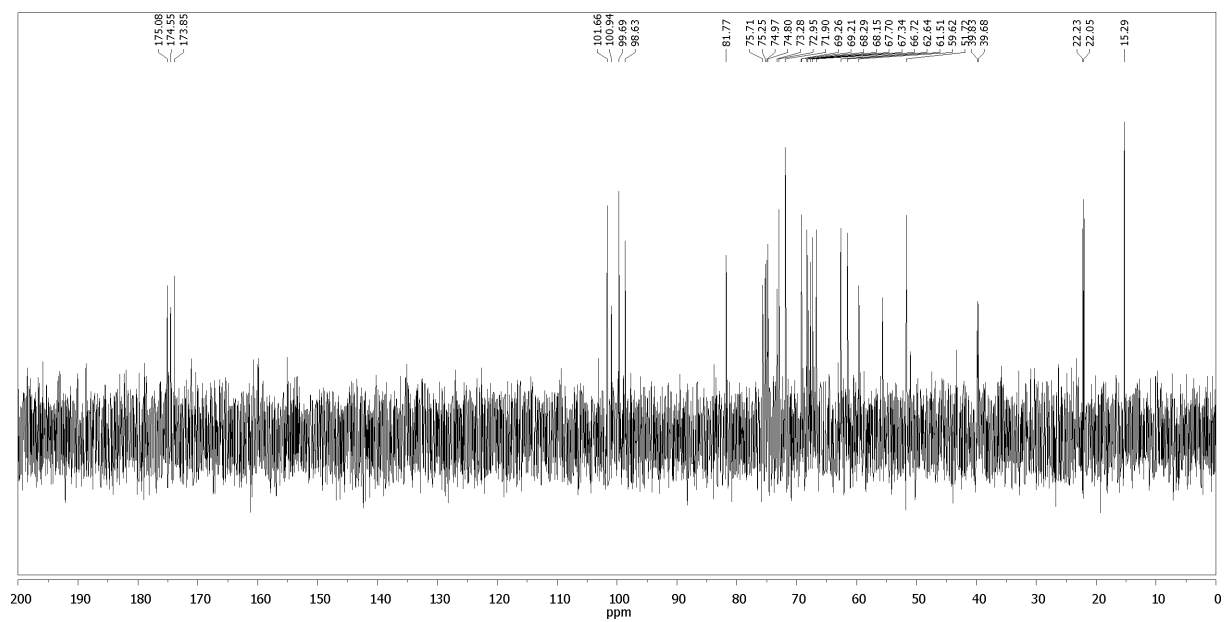


(2-Aminoethyl)- α -sialyl-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -L-fucosyl-(1 \rightarrow 3)]-N-acetyl- β -D-glucosaminid (86)

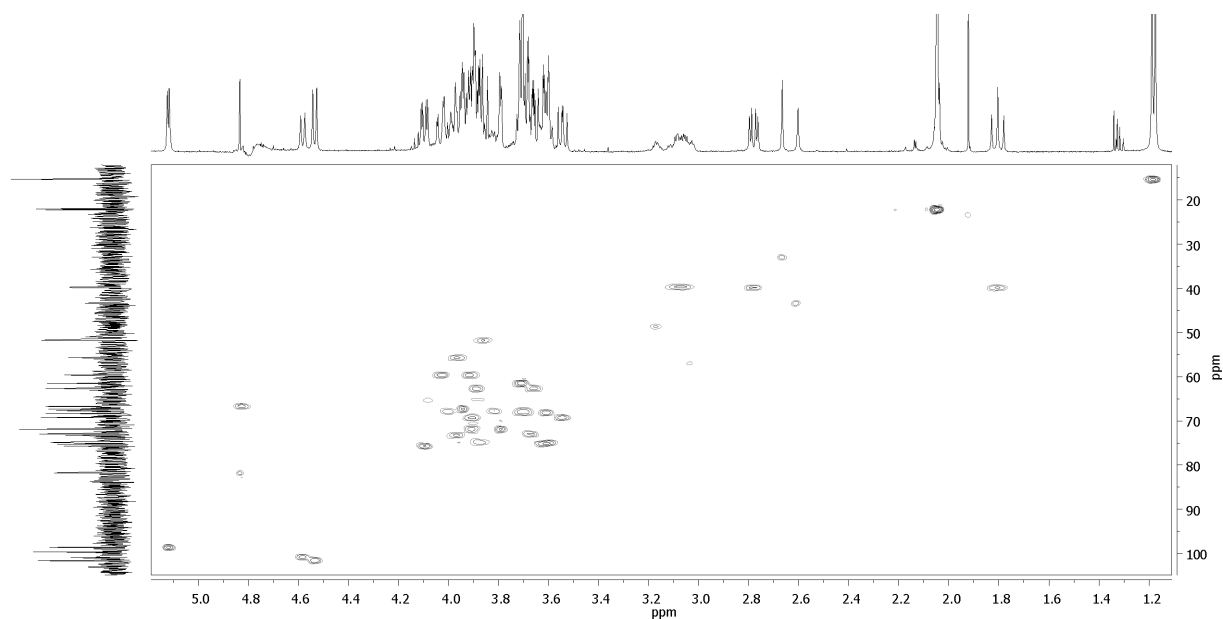


¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, D₂O):

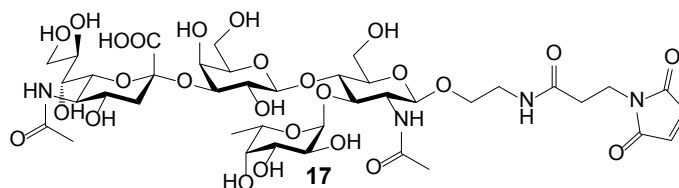


$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (500 MHz, D_2O): ^{13}C -NMR-Spektrum (126 MHz, D_2O):

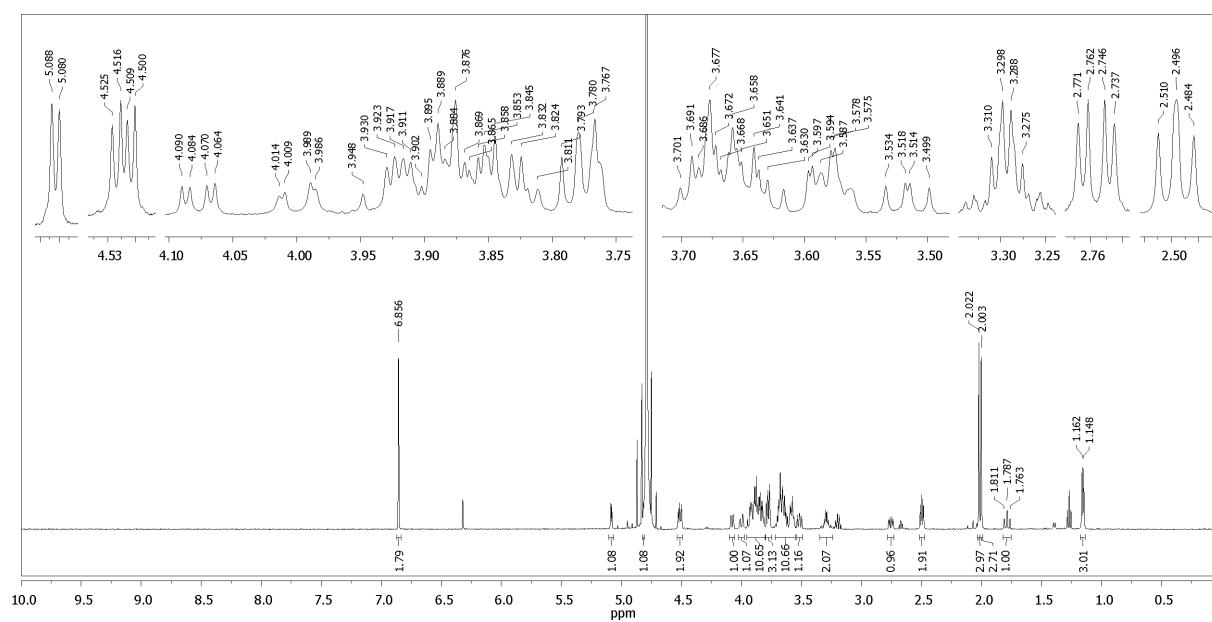
HSQC-Spektrum (500/126 MHz, D₂O):



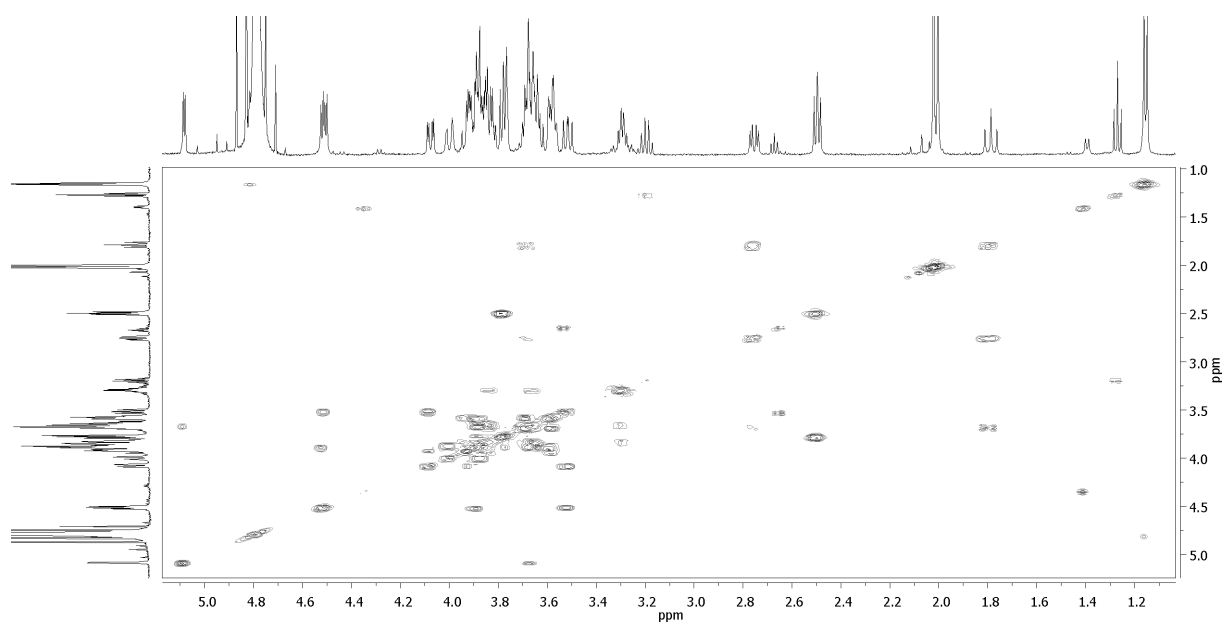
(*N*-(3'-Maleimidopropanoyl)-2-aminoethyl)- α -sialyl-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -L-fucosyl-(1 \rightarrow 3)]-*N*-acetyl- β -D-glucosaminid (17)



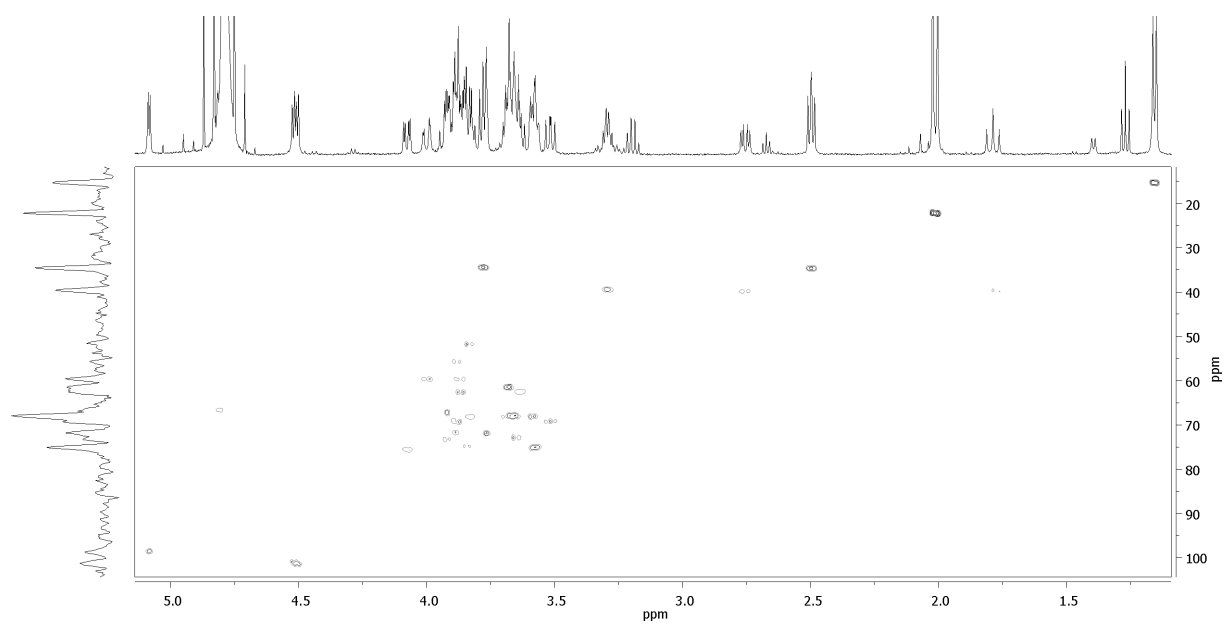
¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, D₂O):

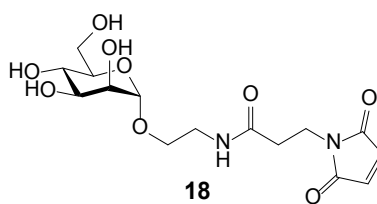
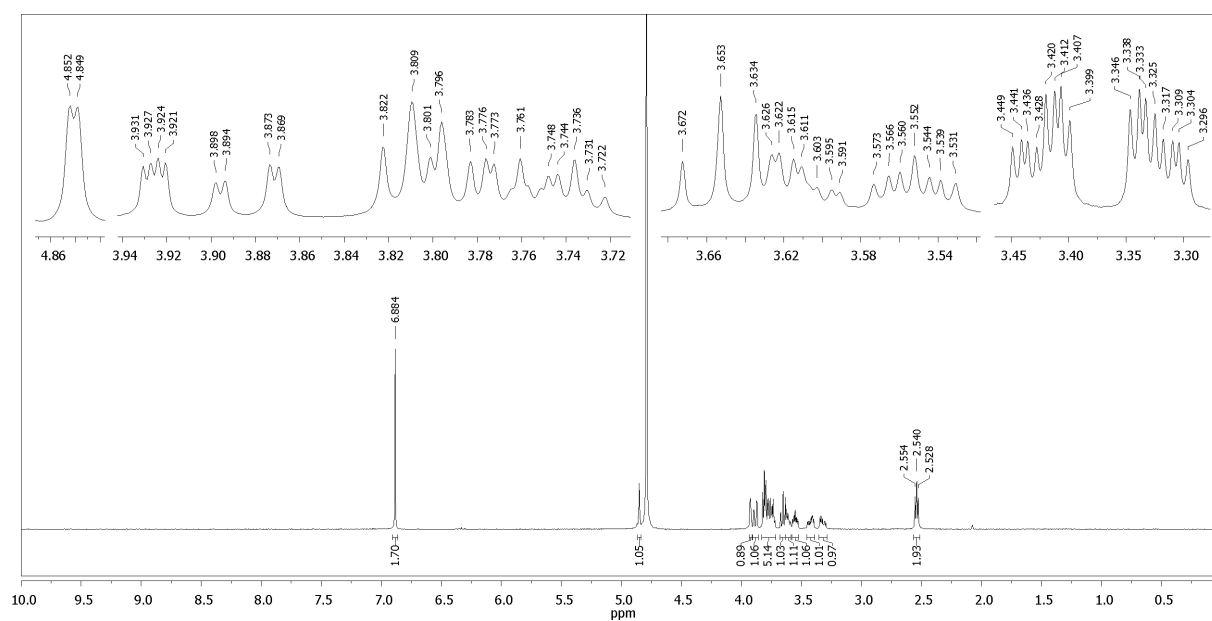
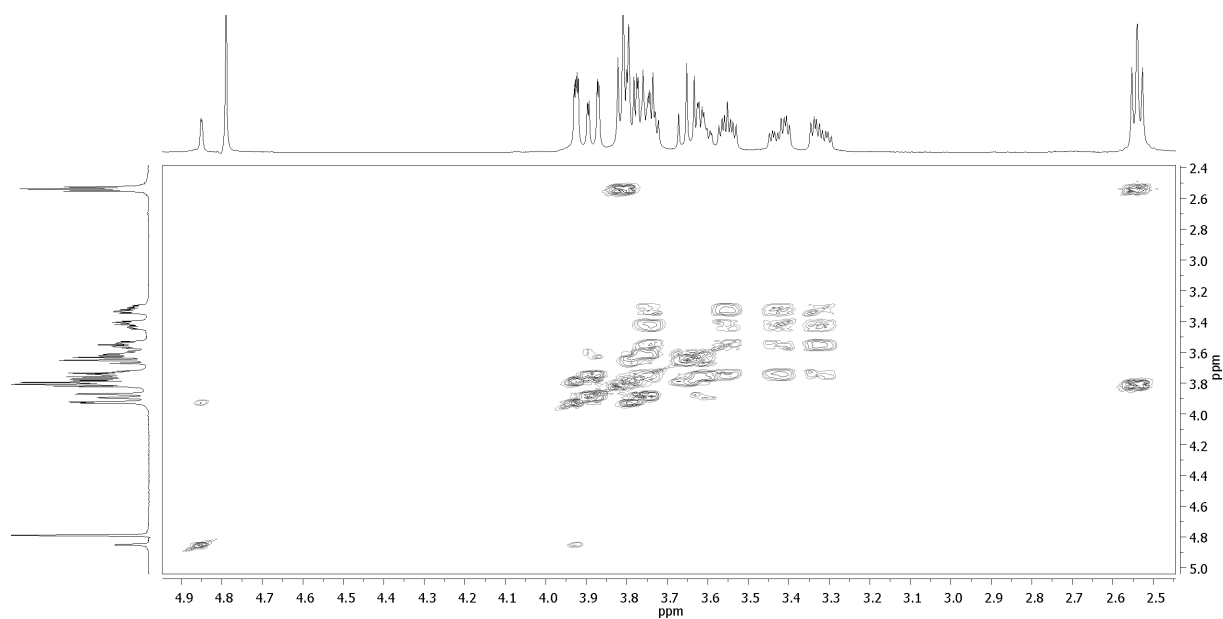


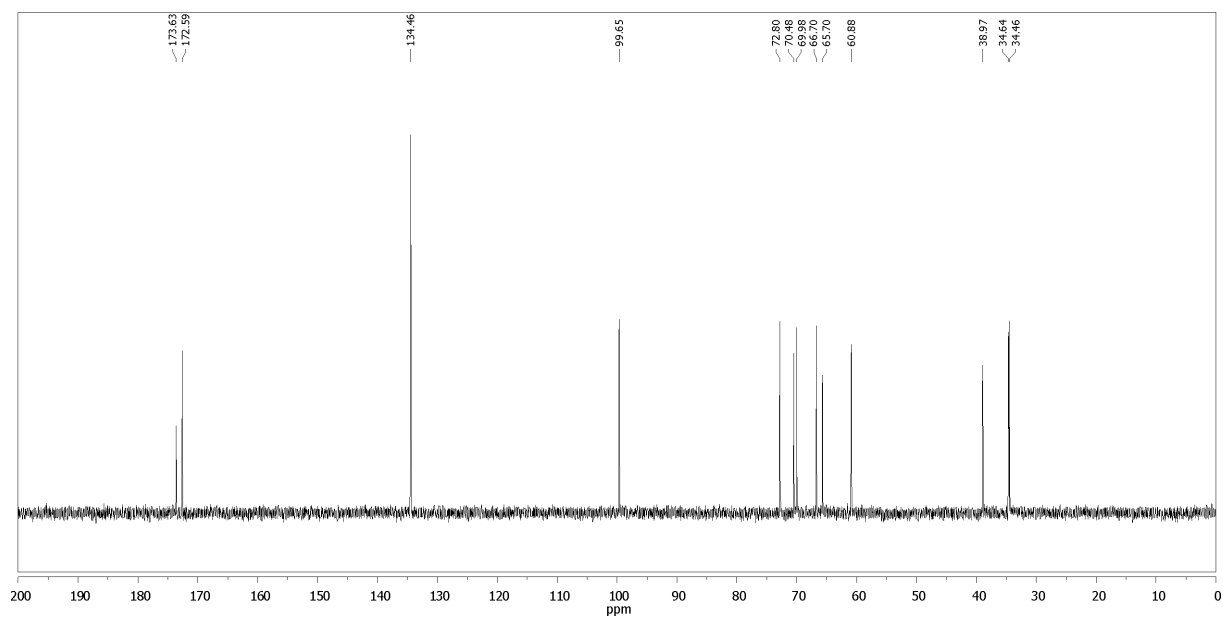
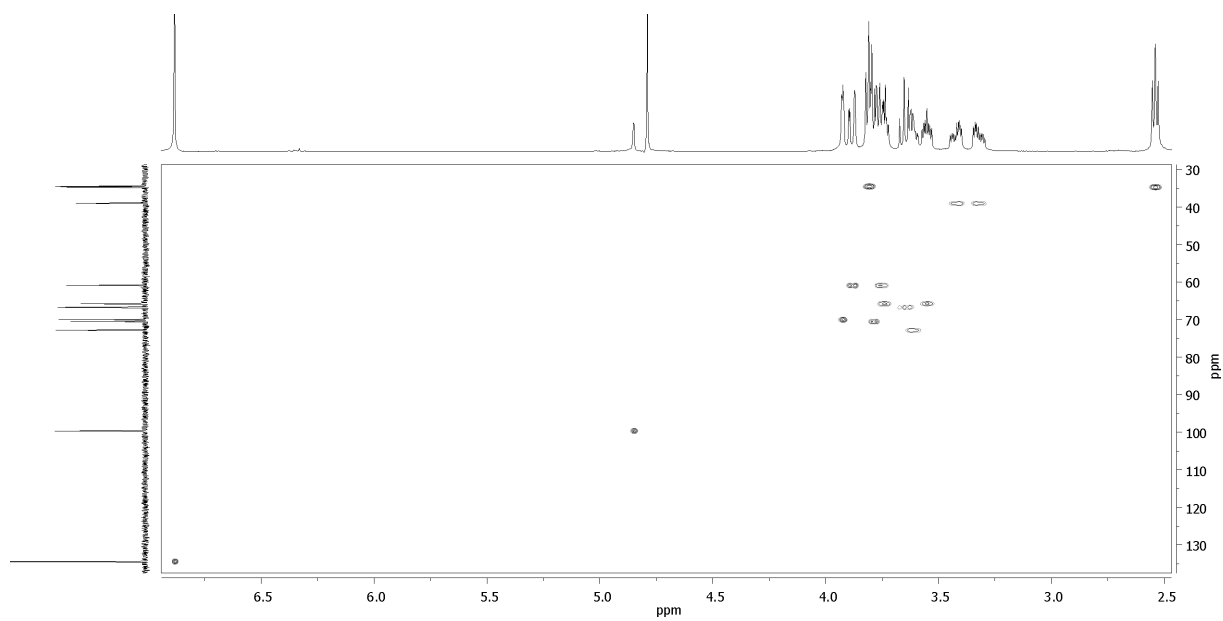
$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (500 MHz, D_2O):

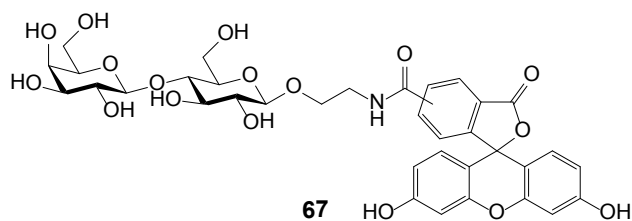
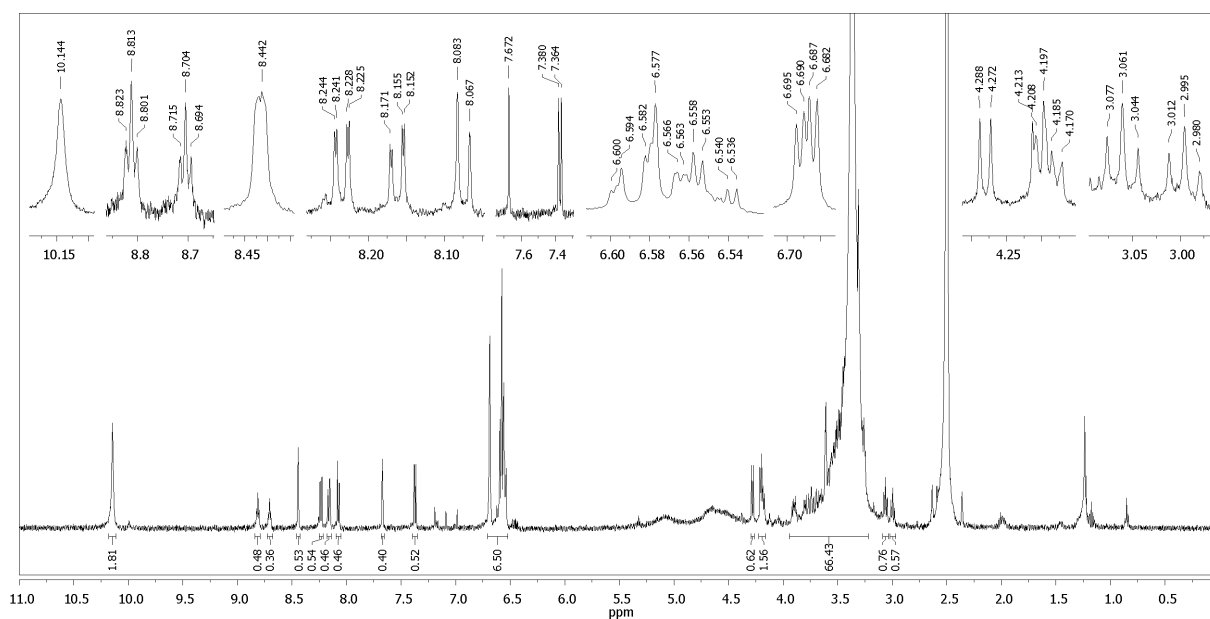
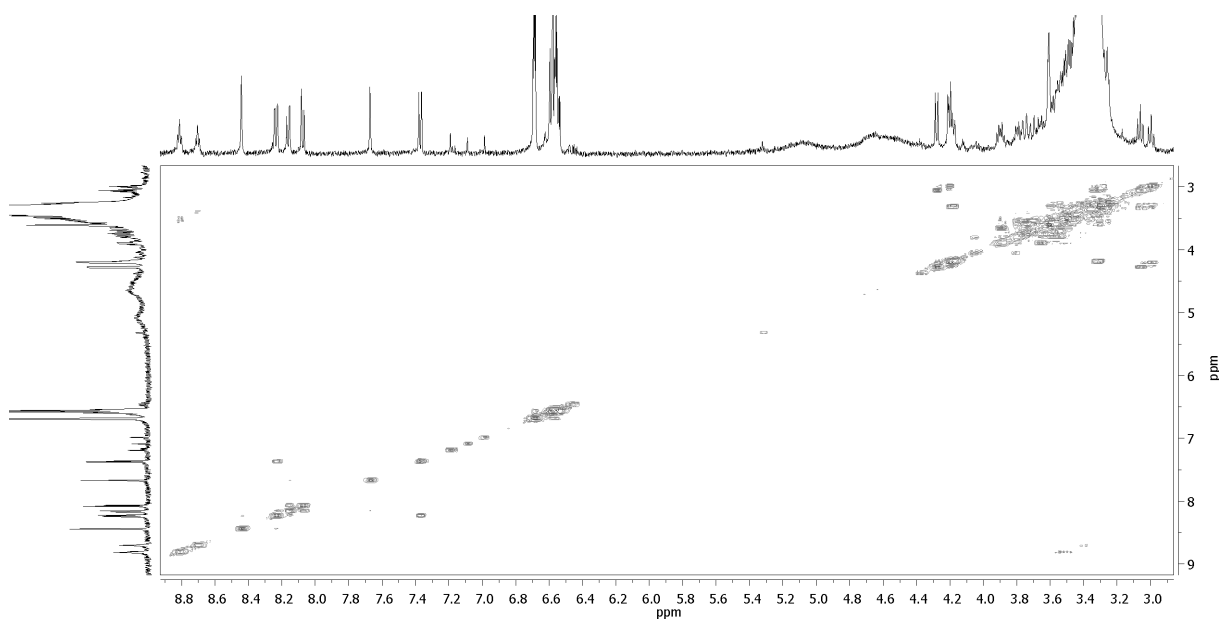


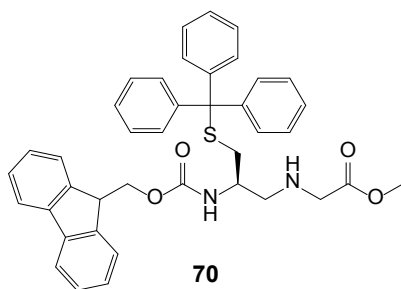
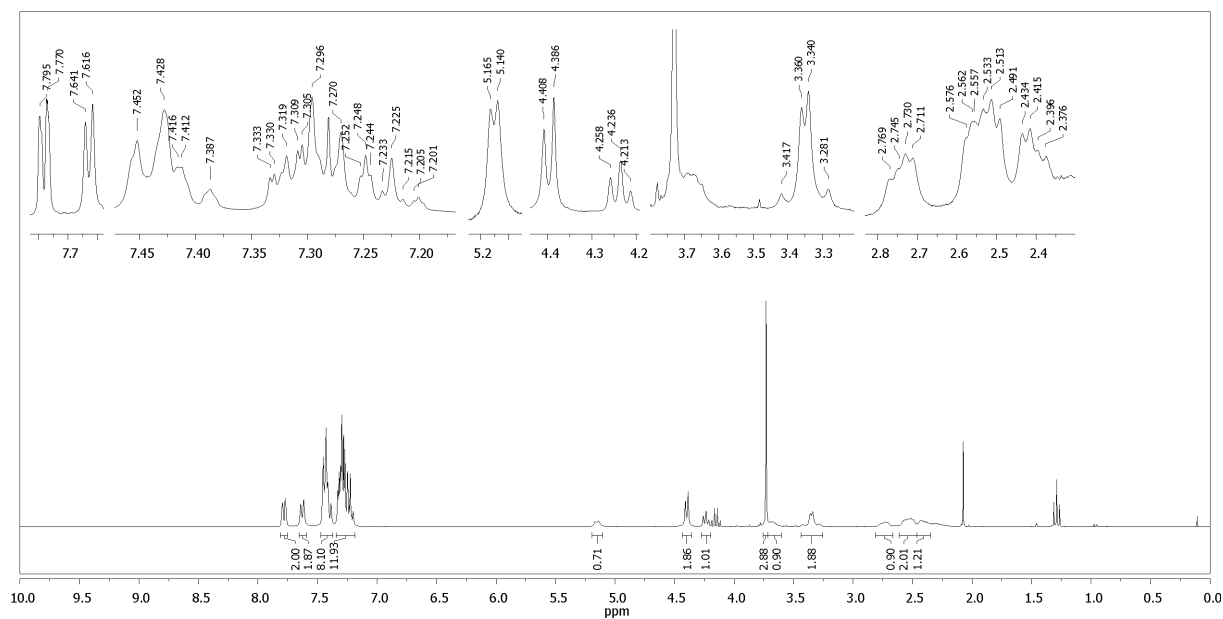
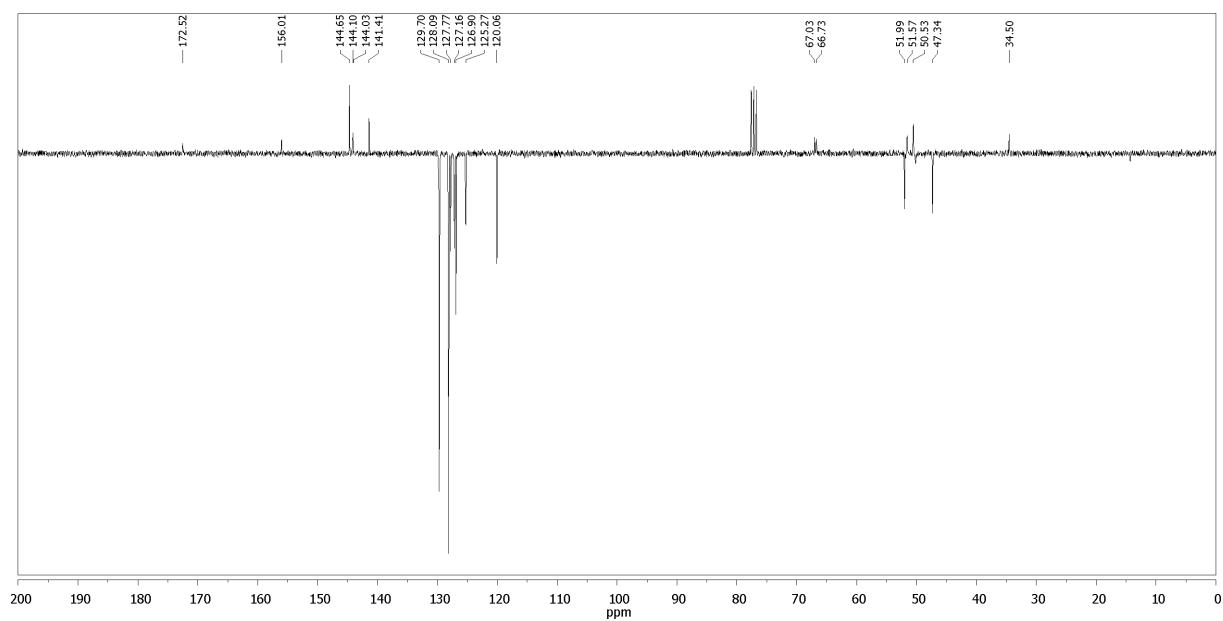
HSQC-Spektrum (500/126 MHz, D_2O):



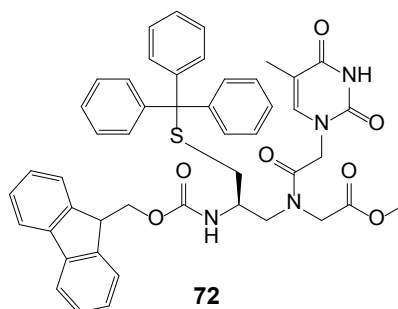
(*N*-(3'-Maleimidopropanoyl)-2-aminoethyl)- α -D-mannosid (18) ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, D_2O): $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (500 MHz, D_2O):

^{13}C -NMR-Spektrum (126 MHz, D_2O):HSQC-Spektrum (500/126 MHz, D_2O):

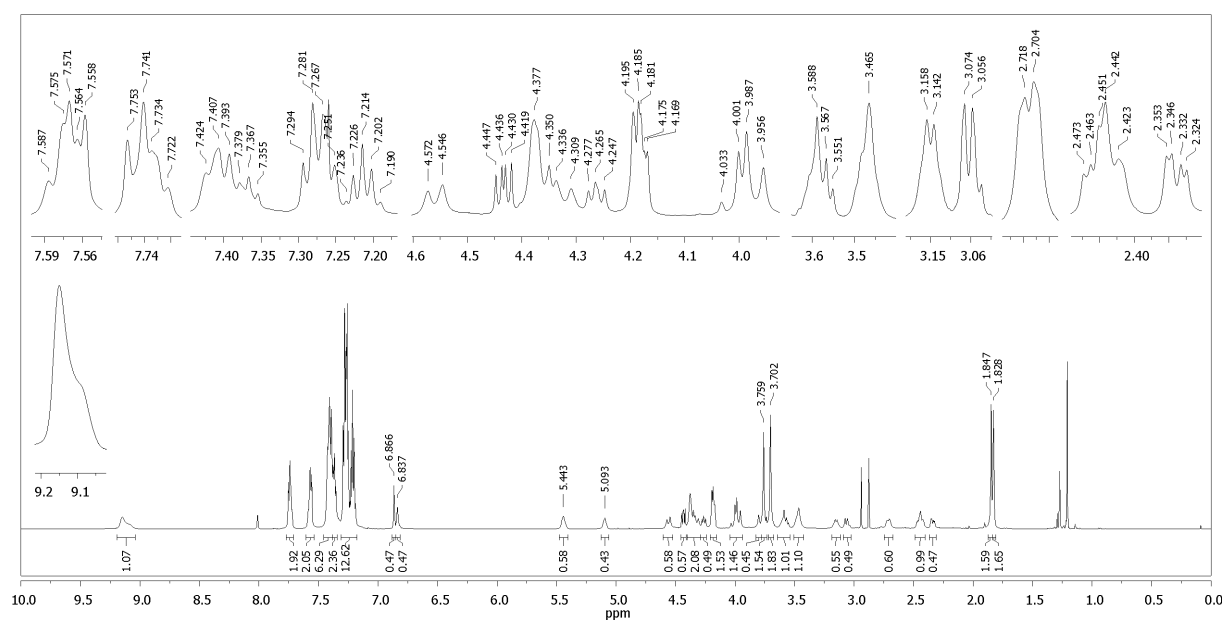
(N-(5(6)-Carboxyfluoresceinoyl)-2-aminoethyl)- β -D-lactosid (67) ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO- d_6): $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (500 MHz, DMSO- d_6):

(R)-N-Fluorenylmethoxycarbonyl-1-(S-tritylthiomethyl)-aminoethylglycinmethylester (70)**¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃):****APT-Spektrum (75 MHz, CDCl₃):**

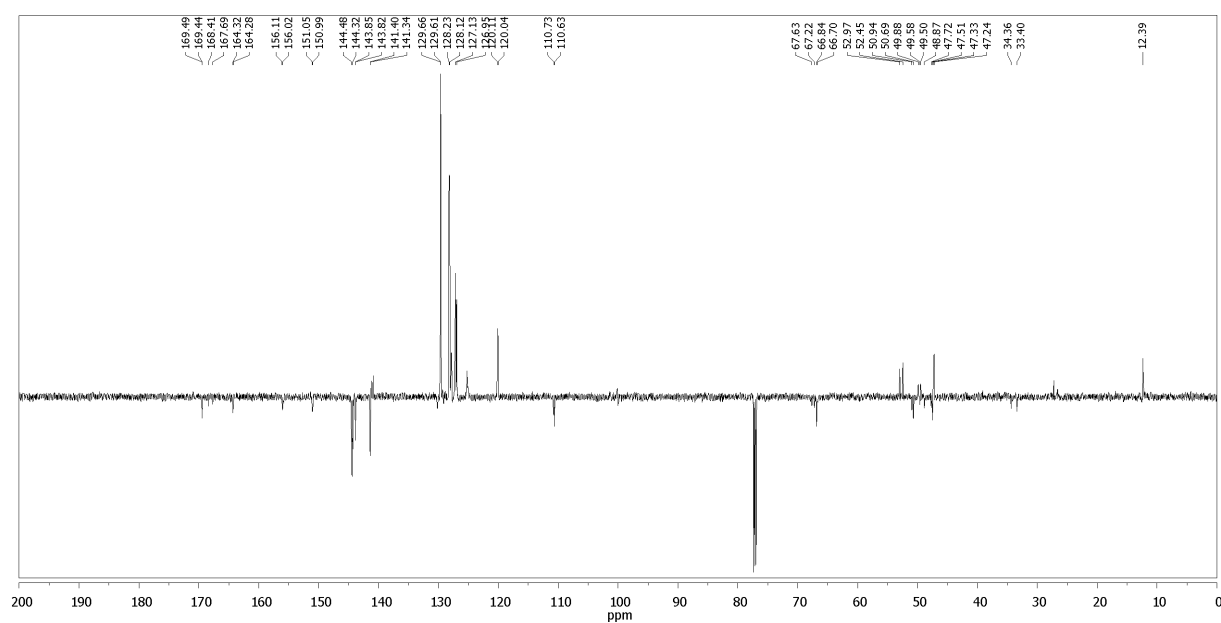
(*R*)-*N*-[*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-1-(*S*-tritylthiomethyl)-aminoethyl]-*N*-[(1-thyminy)-acetyl]-glycinmethylester (72)



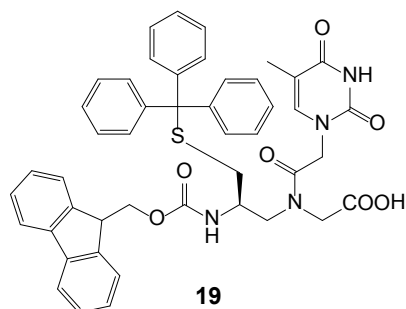
^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, CDCl_3):



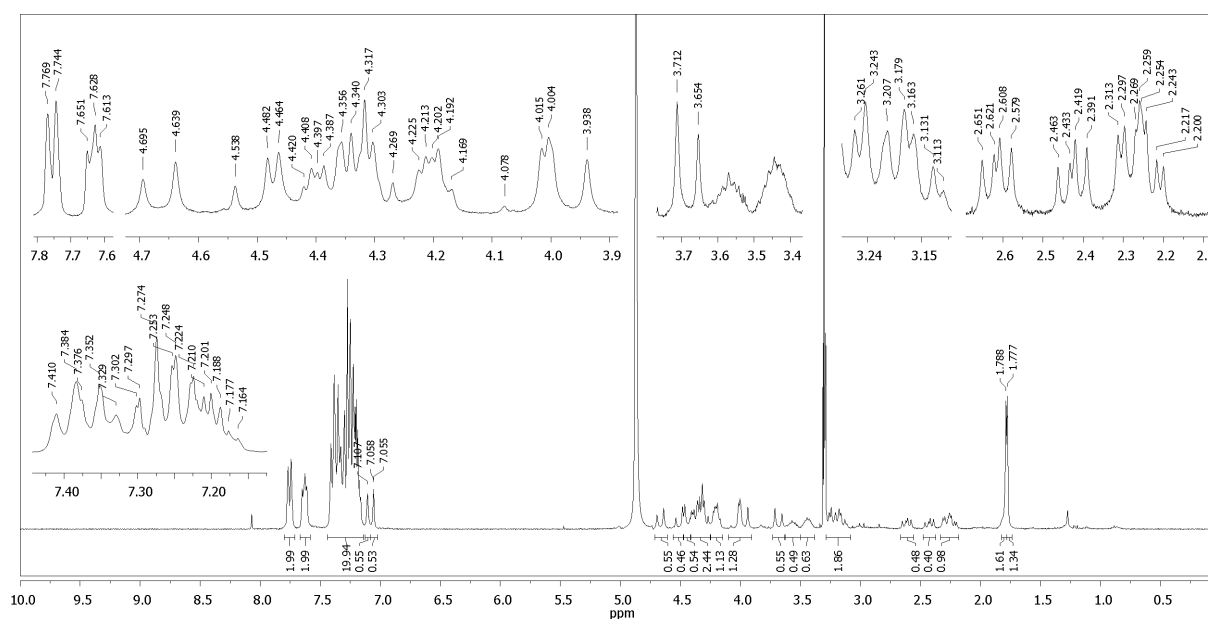
APT-Spektrum (151 MHz, CDCl_3):



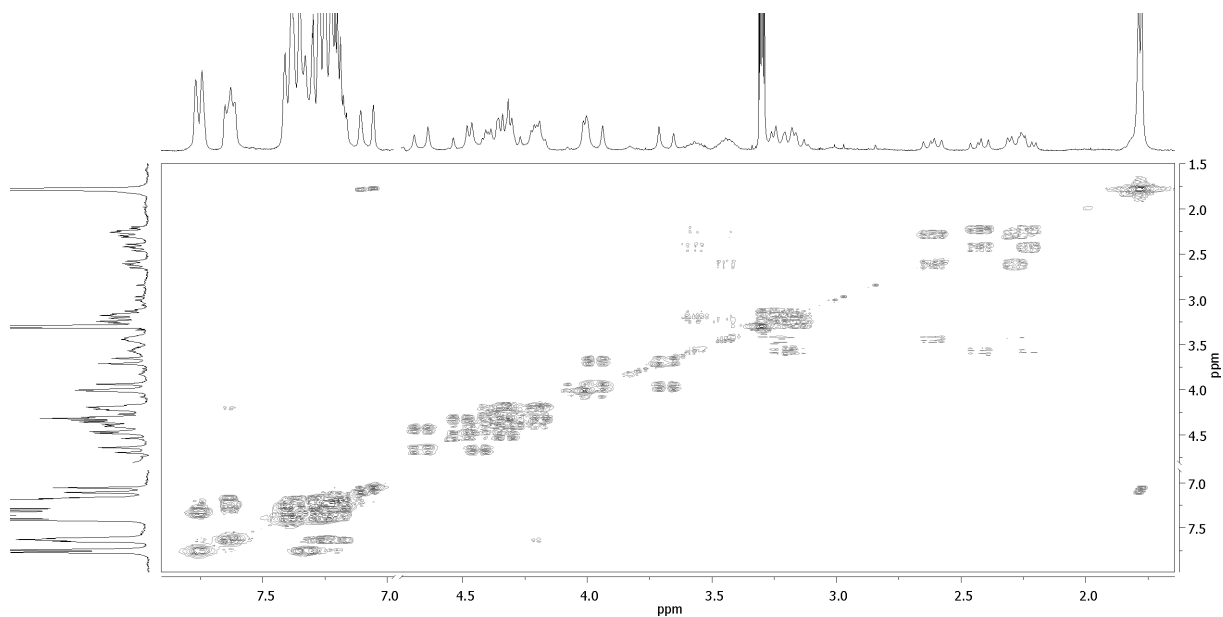
(R)-N-[N-Fluorenylmethoxycarbonyl-1-(S-tritylthiomethyl)-aminoethyl]-N-[(1-thyminy)-acetyl]-glycine (19)

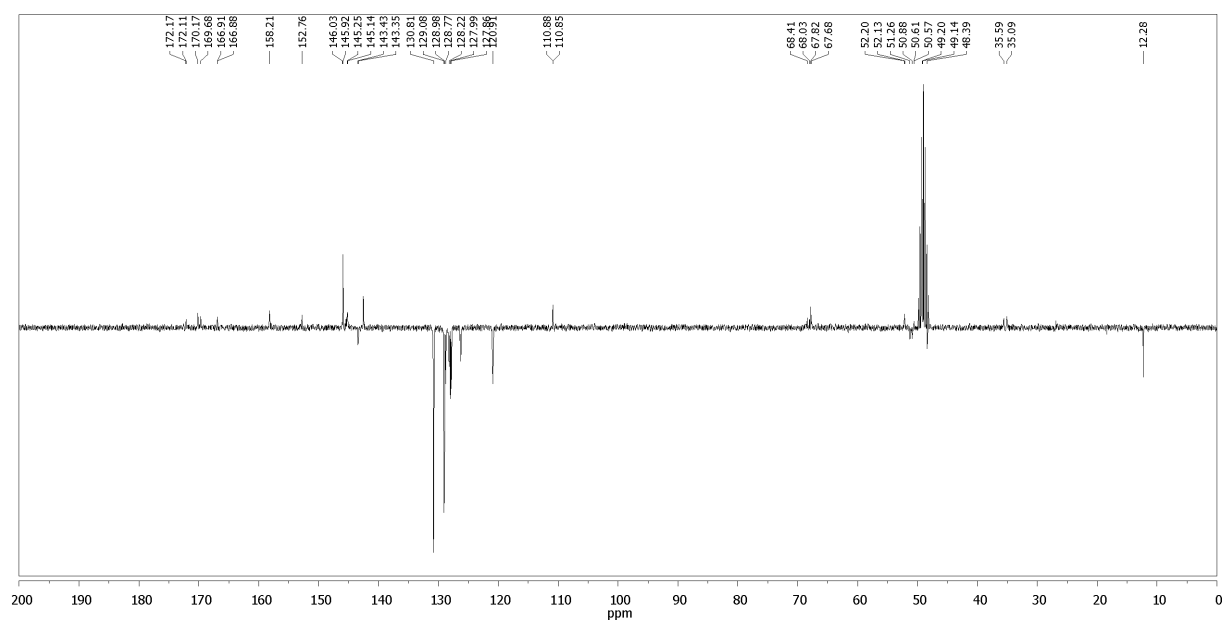
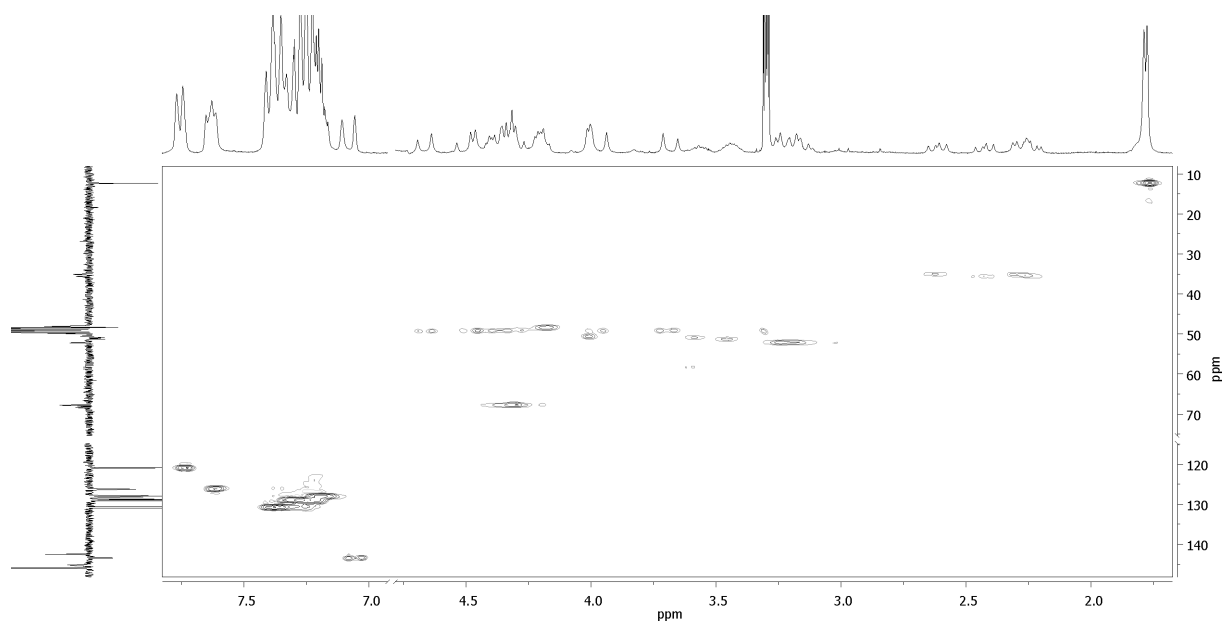


^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, CD_3OD):



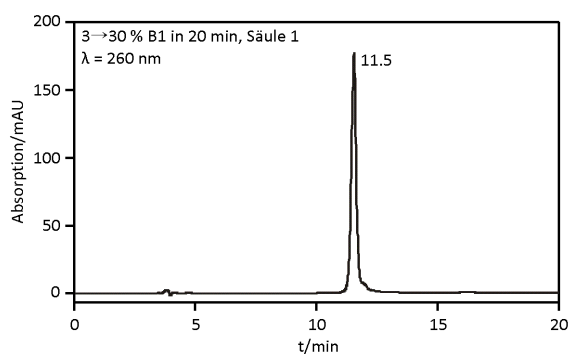
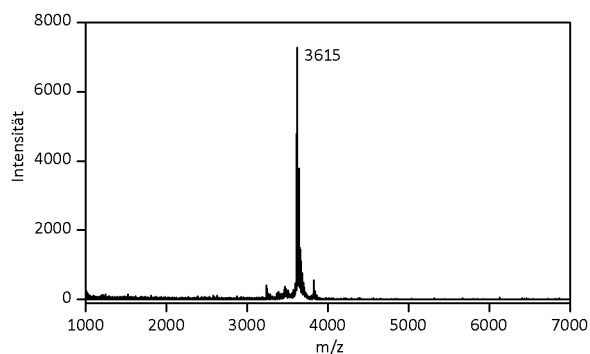
^1H , ^1H -COSY-Spektrum (300 MHz, CD_3OD):



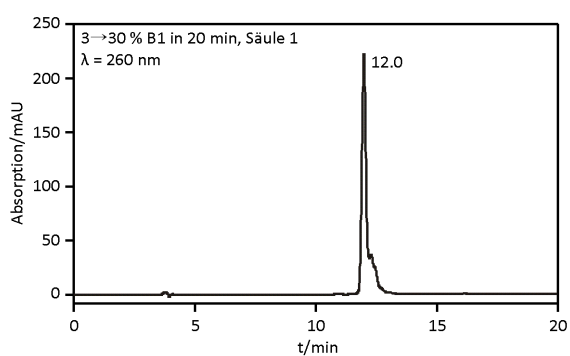
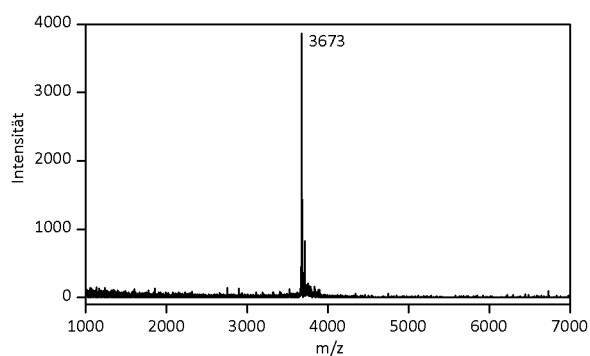
^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz, CD_3OD):HSQC-Spektrum (300/75 MHz, CD_3OD):

8.2 HPLC-Chromatogramme und MALDI-Spektren der PNA-Oligomere

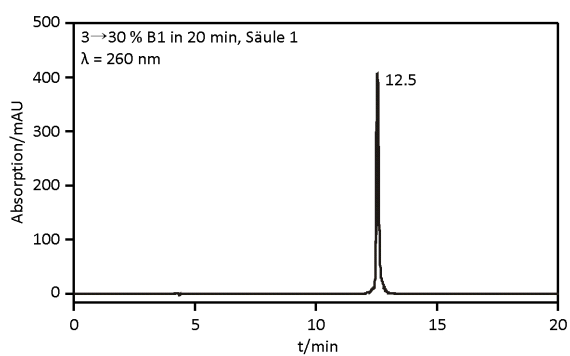
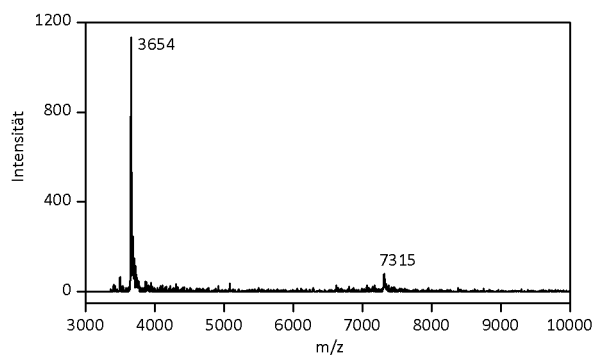
H-actt(CH₂SH)acctcacgc-Lys-NH₂ (73)



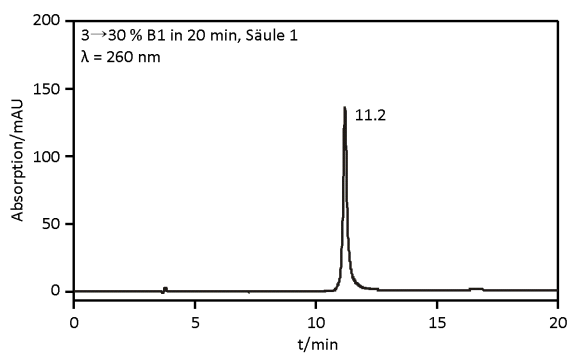
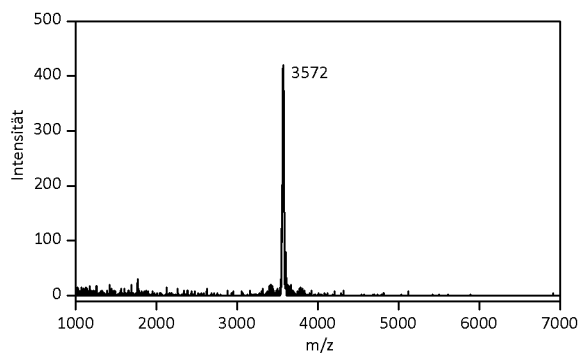
H-cagtcacagt(CH₂SH)tcc-Lys-NH₂ (74)

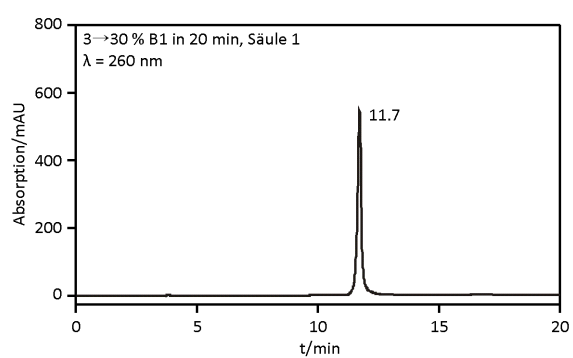
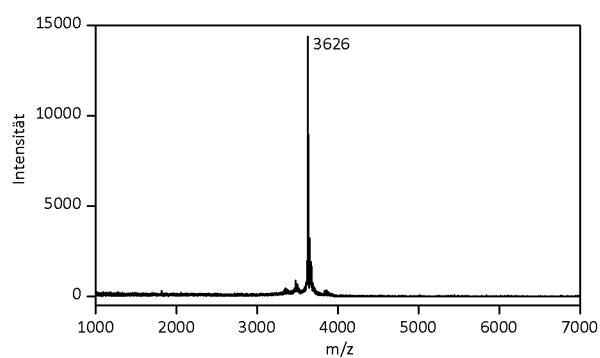
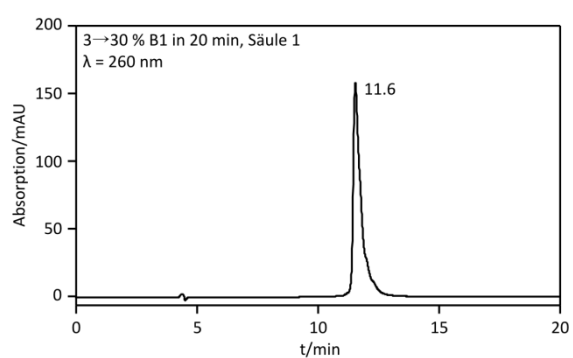
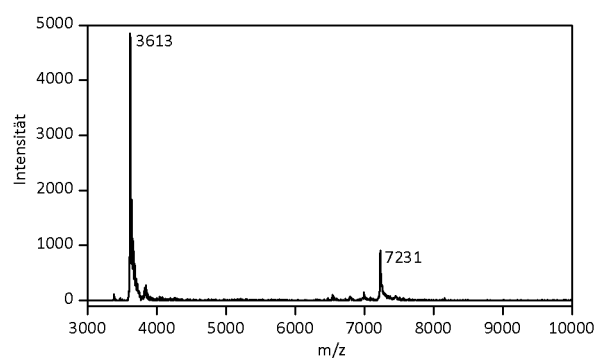
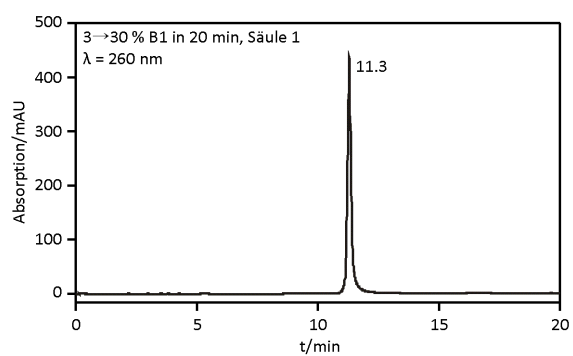
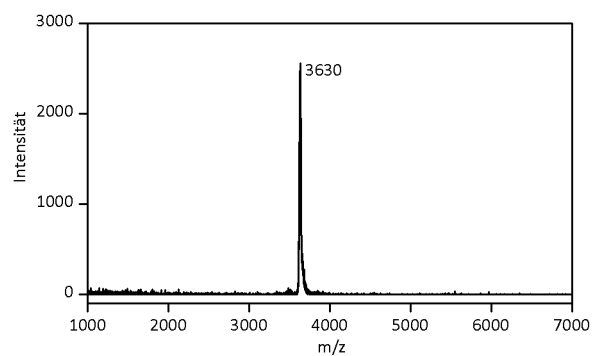
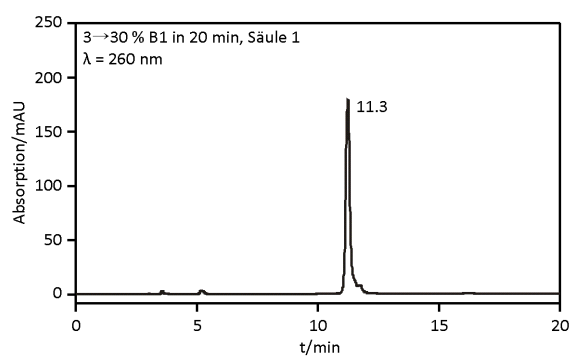
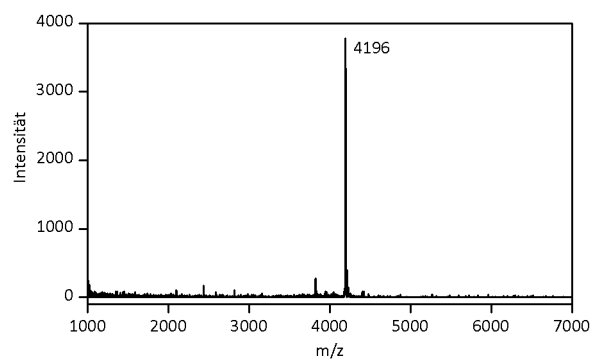


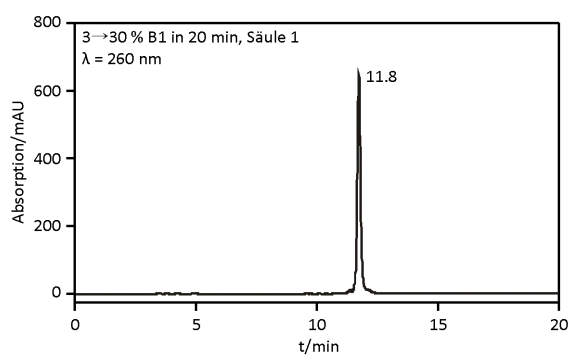
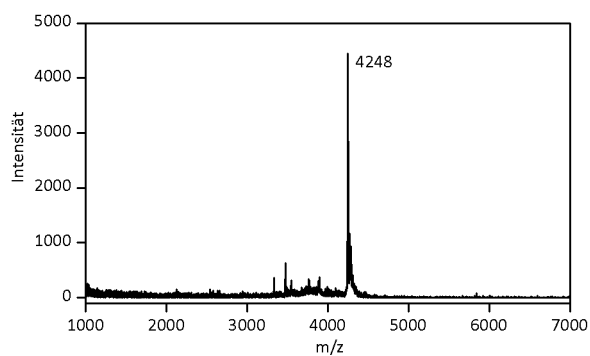
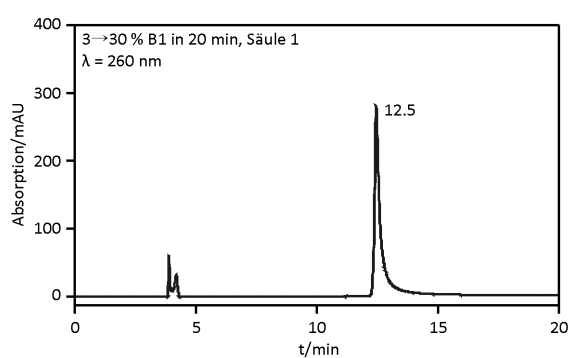
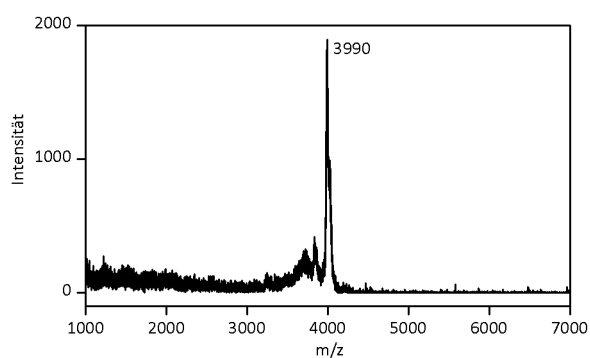
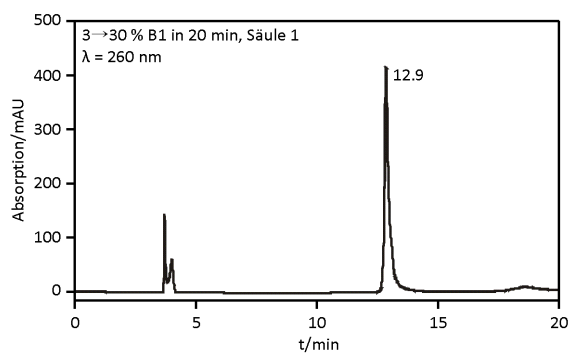
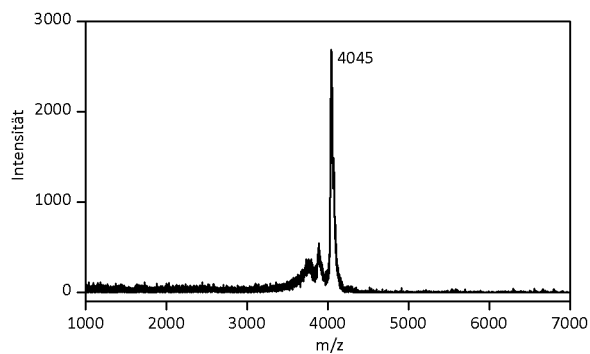
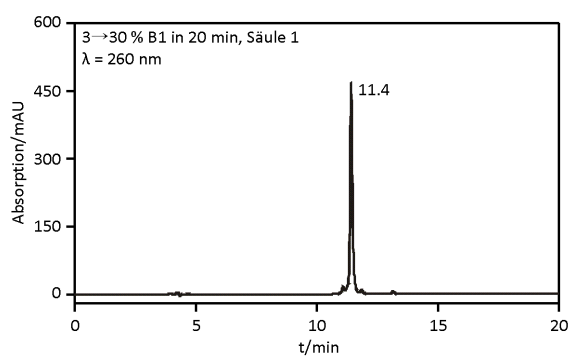
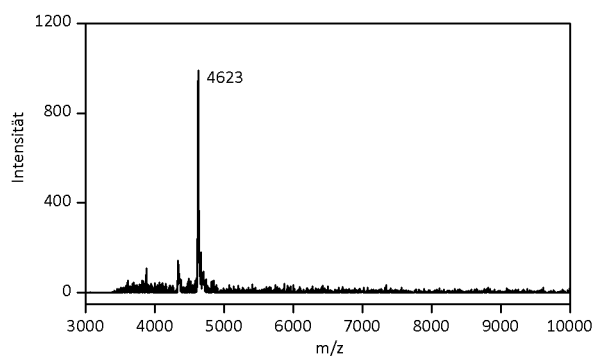
H-aactcctgtt(CH₂SH)gct-Lys-NH₂ (75)

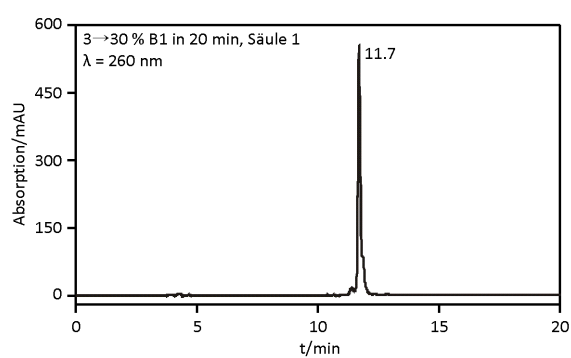
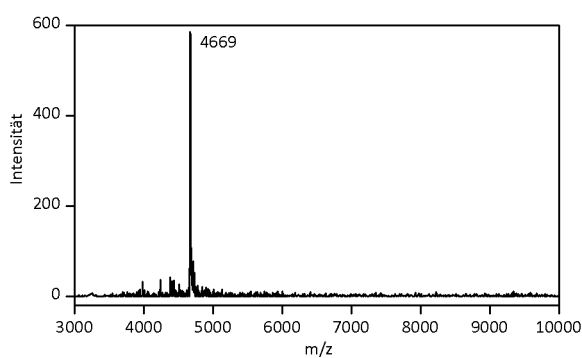
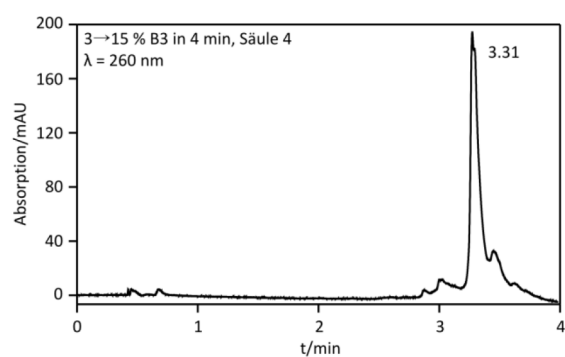
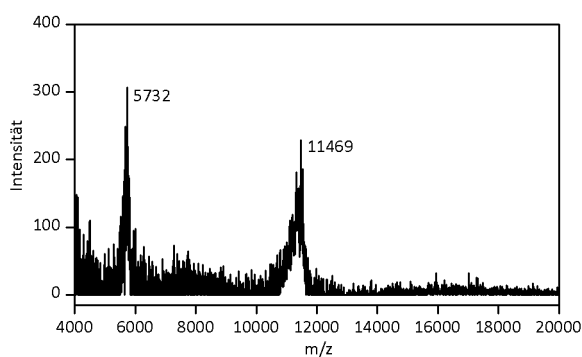
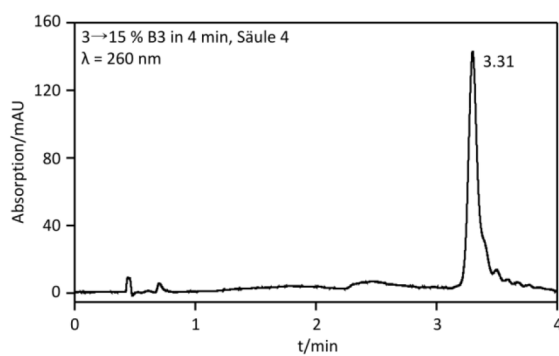
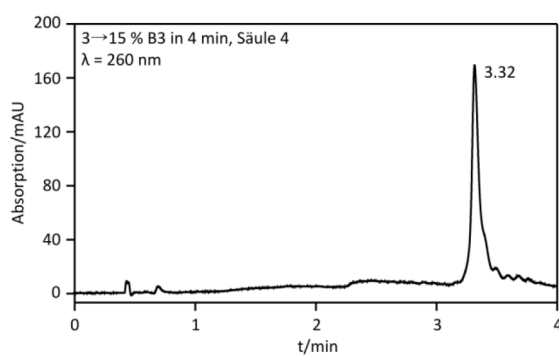


H-acttacctcacgc-Lys-NH₂ (76)



H-cagtcagtgtcc-Lys-NH₂ (77)**H-aactcctgttgct-Lys-NH₂ (78)****H-caatcgtatccag-Lys-NH₂ (79)****H-actt(CH₂S~βLacNAc)acctcagc-Lys-NH₂ (82)**

H-cagtcatagt(CH₂S~βLacNAc)tcc-Lys-NH₂ (84)**H-actt(CH₂S~αMan)acctcacgc-Lys-NH₂ (83)****H-cagtcatagt(CH₂S~αMan)tcc-Lys-NH₂ (85)****H-actt(CH₂S~βsLe^x)acctcacgc-Lys-NH₂ (87)**

H-aactcctgtt(CH₂S~βsLe^x)gct-Lys-NH₂ (88)**5'-[N-(3'-Maleimidopropanoyl)-6-aminoethyl]-GCG GTA ACC AGT ACA AGG TGC TAA ACG TAA TGG CGC-3' (22)****H-actt(CH₂S~Aptamer)acctcacgc-Lys-NH₂ (90)****H-aactcctgtt(CH₂S~Aptamer)gct-Lys-NH₂ (91)**

8.3 Abkürzungsverzeichnis

Die Nukleobasen sind bei PNA-Oligomeren durch Kleinbuchstaben und bei DNA-Oligomeren durch Großbuchstaben abgekürzt.

Ac	Acetyl
Äq	Äquivalent(e)
AU	willkürliche Einheit
Bhoc	Benzhydryloxycarbonyl
Bn	Benzyl
Boc	<i>tertiär</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin
Bu	Butyl
Bz	Benzoyl
ca.	circa
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CIAP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CD34	cluster designation 34
CD44	cluster designation 44
CMP	Cytidin-5'-monophosphat
CMP-Neu5Ac	Cytidin-5'-monophospho- <i>N</i> -acetyl- β -D-neuraminsäure
ConA	Concanavalin A
CST	<i>Campylobacter</i> Sialyltransferase
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
Da	Dalton
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodimid
d. h.	das heißt
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMTST	Dimethyl(methylthio)sulfoniumtrifluormethansulfonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Enzyme Commission
ECL	<i>Erythrina cristagalli</i> Lektin
EDT	1,2-Ethandithiol
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunosorbent-Assay
ELLA	Enzym-gekoppelter Lektin-Assay

EPR	Elektronenspinresonanz
ESL-1	E-Selektin-Ligand 1
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FAM	Carboxyfluorescein
Fmoc	9-Fuorenylmethoxycarbonyl
FT	Fouriertransformation
Fuc	Fucose
FucTase	Fucosyltransferase
Gal	Galactose
GalTase	Galactosyltransferase
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GDP-Fuc	Guanosin-5'-diphospho- β -L-fucose
Glc	Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
Gly	Glycin
GlyCAM-1	glykosyliertes Zelladhäsionsmolekül 1
HCTU	2-(6-Chlor-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminiumhexafluorphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR	hochaufgelöst
HRP	Meerrettichperoxidase
<i>i</i>	<i>iso</i>
ICR	Ionenzyklotronresonanz
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
kat.	katalytisch
LacNAc	<i>N</i> -Acetyllactosamin
Lys	Lysin
M	molar
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
Man	Mannose
Me	Methyl
mP	Millipolarisations-Einheit
MS	Massenspektrometrie

	Molsieb
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetyl- β -D-neuraminsäure
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMR	Kernmagnetresonanz
<i>p</i>	<i>para</i>
PAA	Poly[<i>N</i> -(2-hydroxyethyl)acrylamid]
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PMP	<i>para</i> -Methoxyphenyl
PNA	Peptidnukleinsäure
Pr	Propyl
PSGL-1	P-Selektin-Glykoproteinligand 1
QIT	Quadrupol Ionenfalle
QP	Quadrupol
quant.	quantitativ
RCA ₁₂₀	<i>Ricinus communis</i> Agglutinin
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RU	response unit(s)
SialTase	Sialyltransferase
sLe ^x	Sialyl-Lewis-X
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz
Su	Succinimidyl
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphinhydrochlorid
<i>tert</i>	<i>tertiär</i>
THF	Tetrahydrofuran
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Flugzeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Troc	Trichloroxycarbonyl
Trt	Triphenylmethyl
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UDP-Gal	Uridin-5'-diphospho- α -D-galactose
UMP	Uridin-5'-monophosphat
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography

TFA	Trifluoressigäure
Troc	Trichloroxycarbonyl
WGA	Weizenkeimagglutinin
z. B.	zum Beispiel

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. Oliver Seitz für seine fortwährende Unterstützung während meiner Promotion, für schöne Gruppenausflüge und für die Möglichkeit zur Teilnahme an interessanten Konferenzen.

Besonders bedanken möchte ich mich zudem bei Dr. Warren Wakarchuk vom National Research Council Canada und bei Chun-Hung Lin, Ph.D. von der Academia Sinica in Taiwan für die Bereitstellung der Sialyltransferase und der Fucosyltransferase. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 765) danke ich für die Bereitstellung einer Stelle als wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Humboldt-Universität zu Berlin sowie der Ermöglichung zahlreicher Seminare.

Für die zügige und kritische Durchsicht der Arbeit und die nützlichen Anmerkungen danke ich Franziska Diezmann, Felix Hövelmann, Julia Michaelis und Anne Erben.

Der gesamten Arbeitsgruppe Seitz und der Arbeitsgruppe Arenz danke ich für die großartige Atmosphäre. Sie hielten stets die Geräte am Laufen und standen mir bei Problemen mit Rat und Tat zur Seite. Meinen Laborkollegen Frank Abendroth, Dr. Sven Hainke, Dr. Xiao-Hua Chen, Brigitte Redlich und Dr. Andrea Knoll danke ich für das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere gilt mein Dank Frank Obermeit, der mich als Auszubildender bei meiner Arbeit tatkräftig unterstützte und zudem das ganze Labor auch bei ungeliebten Aufgaben entlastete. Auch die Arbeit mit meinen Forschungspraktikanten Simon Loibl, Katharina Gröger und Larissa Schmidt hat viel Spaß gemacht.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Jens Dervedde und seinen Mitarbeitern von der Charité Berlin bedanken. Dr. Sven Enders arbeitete mich in das Biacore ein und gab mir wertvolle Hilfestellungen bei den SPR-Messungen. Dr. Stefanie Wedepohl und Sebastian B. Riese danke ich für die Durchführung der Selektin-Bindungsassays. Alexander Bujotzek und Dr. Marcus Weber vom Zuse Institut Berlin führten zudem moleküldynamische Simulationen für mich durch. Des Weiteren danke ich der gesamten Analytikabteilung der Humboldt-Universität zu Berlin.

Vor allem aber möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Sie standen stets hinter mir und haben mich bei meinen Vorhaben unterstützt.

LEBENS LAUF

- entfernt -

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Beiträge in wissenschaftlichen Journalen

Christian Scheibe, Alexander Bujotzek, Jens Dervede, Marcus Weber, Oliver Seitz

„DNA-programmed spatial screening of carbohydrate–lectin interactions”

Chemical Science **2011**, 2 (4), 770 – 775

Christian Scheibe, Oliver Seitz

„PNA-sugar conjugates as tools for the spatial screening of carbohydrate–lectin interactions”

Pure and Applied Chemistry **2012**, 84 (1), 77 – 85

Christian Scheibe, Franziska Diezmann, Hendrik Eberhard, Oliver Seitz

„DNA-guided display of peptides for the spatial screening of protein-protein interactions”

Methods in Molecular Biology **2013**, im Druck

Vorträge

„PNA-sugar conjugates as tools for the spatial screening of carbohydrate-lectin interactions”

16th European Carbohydrate Symposium (Eurocarb16)

4. Juli 2011, Sorrent, Italien.

„PNA-sugar conjugates as tools for the spatial screening of carbohydrate-lectin interactions”

2nd External Doctoral Student’s workshop of the Graduate School SFB 765

21. September 2011, Rheinsberg-Kleinzerlang, Deutschland

Berlin, Mai 2012

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Christian Scheibe, die vorliegende Dissertation selbständig erarbeitet und verfasst zu haben. Es wurden keine weiteren Quellen und Hilfsmittel als die hier angegebenen verwendet.

.....

Ort, Datum

.....

Unterschrift